UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA

PREPARACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS ESTRELLADAS DEL PÁNCREAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN CELULAR

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA ANIMAL

Autor/a: **Doña María del Carmen Olmo Agudo**

Tutor/a: **Doctor D. Antonio González Mateos**

Los resultados presentados en este trabajo Fin de Grado se ha obtenido dentro de las investigaciones que se están llevando a cabo en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la UEx. La financiación con la que se han llevado a cabo los estudios que se presentan corre a cargo de los siguientes proyectos: Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2016-79259-R y UNEX13-1E-1608) y Junta de Extremadura-FEDER (GR15029).

ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE **7**

2. ABSTRACT AND KEYWORDS **8**

3. INTRODUCCIÓN **9**

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **11**

4.1. EL PÁNCREAS 11

4.1.1. Anatomía: *11*

4.1.2. Irrigación: *13*

4.1.3. Inervación *14*

4.1.4. Estructura *14*

4.1.4.1 Páncreas endocrino: 15

Células del páncreas endocrino: 15

4.1.4.2 Páncreas exocrino 16

4.1.5. Fisiología *17*

4.1.5.1. Control de la secreción pancreática 21

A) Control nervioso: 21

B) Control hormonal: 22

C) Control paracrino: 23

4.1.5.2 Fases de la secreción pancreática exocrina. 23

A) Fase cefálica: 24

B) Fase gástrica: 24

C) Fase intestinal: 24

D) Fase postabsorción: 25

4.1.5.3 Vías de señalización intracelular 26

A) Vía del calcio y el diacilglicerol (DAG): 26

B) Vía del AMPc: 29

C) Proteínas cinasas (PK): 30

4.2. CÉLULAS ESTRELLADAS DEL PÁNCREAS 31

4.2.1. Historia: *31*

4.2.2. Estructura/Descripción: *32*

4.2.3. Fisiología: *33*

4.2.3.1. Propiedades: 33

4.2.3.2. Matriz extracelular: 35

4.2.3.3. Activación de las células estrelladas del páncreas: 37

Factores de activación: 37

Rutas de señalización: 39
4.2.3.4. Eventos post-activación: 43
4.2.3.5. Importancia del calcio en la fisiología de las células estrelladas del páncreas 45
Mecanismos de acción: 45
Canales para la entrada de calcio 45
Implicaciones de las PSC en la patología pancreática: 46

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO 48

6. METODOLOGÍA 49

6.1. ANIMALES Y MATERIAL 49
6.1.1. ANIMALES: 49
6.1.2. MATERIAL: 49
6.1.3. EQUIPAMIENTO: 51
6.2. MÉTODOS: 52
6.2.1. PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS. 52
6.2.1.1 Medio específico de las células estrelladas pancreáticas: 56
6.2.1.2. Preparación de células para resiembra o experimentación: 57
6.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS PSC: INMUNOCITOQUÍMICA. 59
6.2.2.1. Fundamento: 59
6.2.2.2. Preparación de soluciones para inmunocitoquímica: 61
- Preparación de tampón fosfato (PB) 0.2M: 61
- Preparación de tampón fosfato salino (PBS) 0.01M (Tabla 7): 62
6.2.2.3. Protocolo: 63
6.2.3.VIABILIDAD CELULAR 65
6.2.3.1. Estimulación de células: 66
6.2.3.2. Preparación de placa multipocillos: 66
6.2.4. FLUORESCENCIA. ESTUDIOS DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO 69
6.2.4.1. Fundamento: 69
Determinación de la concentración de calcio libre intracelular 70
6.2.4.2. Carga con el indicador 71
6.2.4.3. Cuantificación de la fluorescencia del fura-2 72
Preparación de estímulos: 72

7. RESULTADOS Y DESARROLLO 73

7.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS. 73
7.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS PSC. INMUNOCITOQUÍMICA 74
7.3. VIABILIDAD CELULAR 75
7.4. ESTUDIOS DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO 76

8. DISCUSIÓN Y POSIBLES LÍNEAS FUTURAS 79

9. CONCLUSIONES 83

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS E INFOGRÁFICAS 84

11. ICONOGRAFÍA Y ANEXOS 92

11.1. FIGURAS: 92

11.2. TABLAS 95

12. AGRADECIMIENTOS 96

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La fisiopatología de la pancreatitis y del cáncer de páncreas no está claramente establecida. Se ha sugerido que las células estrelladas del páncreas (PSC) tienen un papel preponderante en la fibrosis que acompaña a los procesos inflamatorios y el cáncer de páncreas. Las PSC, en presencia de un estímulo externo o interno de determinada naturaleza, van a activarse y fabricar componentes de una matriz extracelular. Cuando el estímulo se mantiene en el tiempo las PSC no se desactivan, y la matriz se hace cada vez más resistente provocando la fibrosis del órgano. Los estudios realizados señalan que el cáncer de páncreas es muy resistente a la acción de los quimioterápicos. Un factor crucial en esta situación es la reacción fibrótica, es decir, el tejido que forma el estroma, que puede llegar a representar hasta el 90% del volumen del tumor. En este *Trabajo Fin de Grado*, de tipo experimental, se describe la preparación de cultivos primarios de PSC y la aplicación de técnicas de inmunocitoquímica que permiten la identificación de marcadores de estas células, el estudio de la viabilidad celular y la monitorización de la concentración de calcio libre intracelular. Se trata así de investigar su utilidad para el estudio de la función celular.

Palabras clave: páncreas, rata, células estrelladas pancreáticas, viabilidad celular, calcio.

2. ABSTRACT AND KEYWORDS

The pathophysiology of pancreatitis and pancreatic cancer is not well known. It has been suggested that pancreatic stellate cells (PSCs) play a major role in fibrosis accompanying inflammation and cancer in the pancreas. PSC, in the presence of an external or internal stimulus turn into an activated state and begin to secrete componentes of an extracelular matrix. When the stimulus is maintained in time PSC will not turn into non-activated state and the matrix grows and turns more resistent leading to fibrosis in the gland. The existing research points out that pancreatic cancer is highly chemoresistant. A major contributing factor is the stromal or fibrotic reaction, which represents up to 90% of the tumor volume. In this Final Degree Project we describe the preparation of cultures of PSC and application of immunocytochemistry techniques which allow identification of cell markers, study of cell viability and monitorization of changes in intracelular free calcium concentration. We thus aim to investigate their usefulness in the study of cell function.

Keywords: pancreas, rat, pancreatic stellate cells, cellular viability, calcium.

3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un creciente interés sobre el conocimiento de una población celular presente en el páncreas exocrino, concretamente sobre la fisiología de las células estrelladas del páncreas. Este interés es debido al descubrimiento de su implicación en la fibrosis pancreática, presente en enfermedades como pancreatitis crónica o cáncer de páncreas.

Debido a la alta mortalidad que presentan estas enfermedades, no resulta extraño la gran implicación científica existente en el estudio de estas células en busca de un mayor conocimiento sobre el funcionamiento de las mismas.

Las células estrelladas pancreáticas, en presencia de un estímulo externo o interno de determinada naturaleza, van a activarse y fabricar componentes de una matriz extracelular. Ésta va a recubrir el órgano y le va a permitir la recuperación, posteriormente se desactivan y la matriz se elimina. Cuando el estímulo se alarga en el tiempo o se produce de manera reiterada, las células estrelladas no se desactivan, la matriz se hace cada vez más resistente provocando la fibrosis del órgano. Además, las PSC podrían influir en otros tipos celulares vecinos, modulando su crecimiento o participando en los procesos inflamatorios. Se ha sugerido que en el cáncer se establece una relación bidireccional entre las PSC y las células tumorales, que facilita la progresión de estas últimas.

Sin embargo, aún no se conocen exactamente los mecanismos que dan lugar a su activación y/o mantenimiento de su quiescencia, con lo que es fundamental el desarrollo de trabajos de investigación para poder analizar cuáles son estas vías y, aprovechar así, su implicación en las células estrelladas para crear nuevas terapias preventivas y curativas en aquellas enfermedades en las que estén presentes.

Este trabajo experimental se encuadra dentro de un proyecto de investigación que se desarrolla actualmente en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (Entidad financiadora: Convocatoria Nacional Ministerio de Economía y Competitividad 2016, Proyectos RETOS - BFU2016-79259-R), dirigido por el Dr. Antonio González Mateos, cuyo objetivo principal es la preparación de cultivos de células estrelladas de páncreas para, con ellos, estudiar la fisiología de estas células y su papel en la fibrosis pancreática.

En este Trabajo Fin de Grado se realiza una búsqueda de información sobre el páncreas, su anatomía, estructura y fisiología. En segundo lugar, como objeto de estudio de este trabajo, se analiza lo descrito por otros autores sobre las células estrelladas del páncreas, su estructura y su fisiología y el estado actual de las investigaciones. En una tercera parte se realiza un trabajo experimental dirigido a la preparación de cultivos de células estrelladas de páncreas de rata y a su estimulación con diferentes drogas, con vistas a analizar su utilidad para el estudio de la función celular.

Describimos la preparación de los cultivos y la identificación de las células con marcadores de fluorescencia. Tras la preparación de los cultivos aplicamos técnicas de inmunocitoquímica para tratar de identificar marcadores específicos de las células estrelladas pancreáticas; realizamos estudios de viabilidad celular, estimulando las células con distintas sustancias y estudios de microscopía de fluorescencia, con el fin de estudiar variaciones en las concentraciones de calcio libre en el interior de las células.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. EL PÁNCREAS

Es un órgano parenquimatoso con dos funciones principales, una endocrina y otra exocrina.

Como órgano endocrino produce hormonas, como insulina y glucagón, que actúan sobre el hígado y son importantes en el metabolismo de los glúcidos. Estas hormonas se producen en los islotes pancreáticos o Langerhans. La parte exocrina, mediante la secreción de enzimas, es la que produce el jugo pancreático, rico en enzimas digestivas, que es vertido en el duodeno para intervenir en la digestión de los alimentos.

4.1.1. Anatomía:

El páncreas se encuentra en la porción craneal de la cavidad abdominal, detrás del estómago extendiéndose desde el bazo hasta las asas duodenales y consta de tres partes: lóbulo derecho, izquierdo y cuerpo (Figura 1).

En el parénquima se encuentran, entre otros, los acinis glandulares. Éstos vierten su contenido en los conductos excretores que terminarán en los conductos pancreáticos para que el jugo llegue al duodeno.

Los conductos pancreáticos difieren según la especie animal así, en el perro encontramos dos conductos: uno principal que desemboca independientemente del conducto colédoco, y el conducto pancreático accesorio, que desemboca distalmente al

principal en la papila menor del duodeno; los felinos, sin embargo, presentan solo un conducto pancreático que desemboca junto con el conducto colédoco en la papila mayor del duodeno. En vacuno y en cerdo solo encontramos el conducto pancreático accesorio. Los pequeños rumiantes presentan un conducto pancreático principal y el conducto colédoco, que se unen antes de desembocar en el duodeno y forman el conducto hepatopancreático común. En el caballo hay dos conductos pancreáticos; un principal que desemboca conjuntamente con el conducto colédoco en la papila mayor del duodeno, y otro accesorio que desemboca en la papila menor del duodeno (Mayoral, 2013).

El estroma del páncreas está formado por una cápsula fibrosa de la que parten una serie de trabéculas hacia el interior y sostienen al parénquima (Longnecker, 2014).

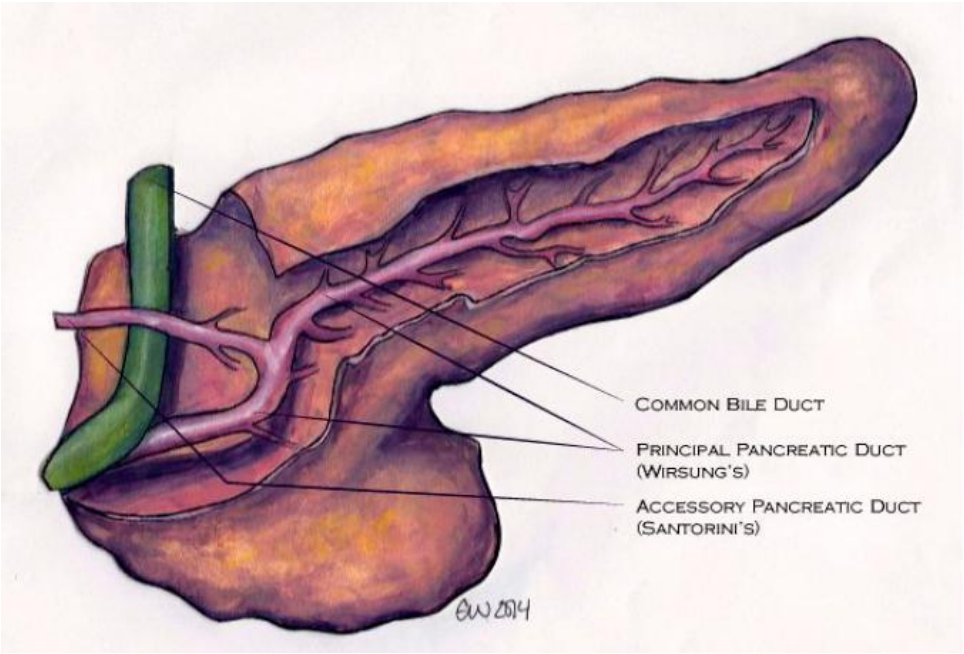


Figura 1: Dibujo de un páncreas normal y sus conductos pancreáticos. De Longnecker, 2014

4.1.2. Irrigación:

Procede de la aorta abdominal, de la que parten la arteria mesentérica craneal y la celiaca (Figura 2).

De la arteria mesentérica craneal sale la arteria pancreáticoduodenal caudal, que irriga las pociones transversa y ascendente del duodeno y el lóbulo derecho del páncreas. La arteria celiaca da lugar a la arteria esplénica y la arteria hepática. La arteria esplénica deriva en unas ramas pancreáticas que irrigan el lóbulo izquierdo del páncreas. De la arteria hepática derivan unas ramas pancreáticas que irrigan la zona del cuerpo del páncreas y la arteria gastroduodenal, de la que sale la arteria pancreáticoduodenal craneal, que irriga las porciones craneales del páncreas y el duodeno.

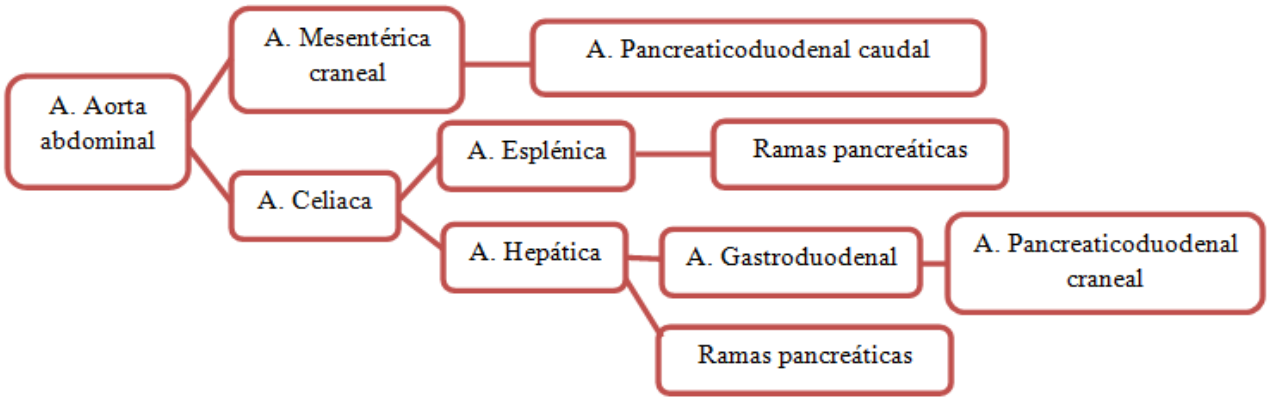


Figura 2 : Esquema del riego arterial del páncreas. Elaboración propia.

El drenaje venoso es llevado a cabo por las venas mesentérica craneal, gastroduodenal y esplénica, que van a drenar a la vena porta, que llega hasta el hígado. Del hígado la sangre sale por las venas hepáticas que desembocan en la vena cava caudal.

El drenaje linfático se lleva a cabo por los vasos linfáticos que llegan a los nódulos linfáticos pancreaticoduodenales, los cuales pertenecen al linfocentro celíaco (Mayoral, 2013).

4.1.3. Inervación

La inervación es llevada a cabo por el sistema nervioso autónomo o vegetativo, en sus divisiones parasimpática y simpática (Babic y Travagli, 2016).

La inervación parasimpática viene dada por el tronco vagal ventral, del que parten unos ramos duodenales que forman el plexo entérico. Las fibras eferentes están constituidas por el núcleo motor dorsal del nervio vago y las neuronas periféricas pancreáticas. Son los encargados de estimular la secreción pancreática exocrina. El complejo vago dorsal del tronco cerebral es el centro de un largo reflejo colinérgico vago-vagal enteropancreático (Jaworek, y cols, 2010). Por lo tanto, el nervio vago es el principal elemento colinérgico que actúa sobre la secreción del páncreas exocrino y sus neurotransmisores más destacados son la acetilcolina (ACh) y el VIP (péptido intestinal vasoactivo).

La inervación simpática llega a las paredes de las arterias de la glándula, mediante el plexo celiaco, el plexo mesentérico craneal y el plexo pancreático. Esta inervación es principalmente indirecta y viene dada por las neuronas simpáticas preganglionares de la médula espinal, las cuales inhiben la secreción pancreática exocrina por disminución del flujo sanguíneo y por la inhibición de la transmisión nerviosa a los ganglios del páncreas (Love y cols, 2007).

4.1.4. Estructura

El páncreas es una órgano glandular con una doble función, endocrina y exocrina, cada una de ellas ejercida por estructuras distintas, islotes de Langerhans y acinos respectivamente. Se encuentra cubierto por una cápsula de tejido conectivo no modelado la cual proyecta unos tabiques hacia el interior que lo divide en lóbulos y lobulillos, con funciones de soporte, y de apoyo a la inervación e irrigación de la glándula (Figura 3).

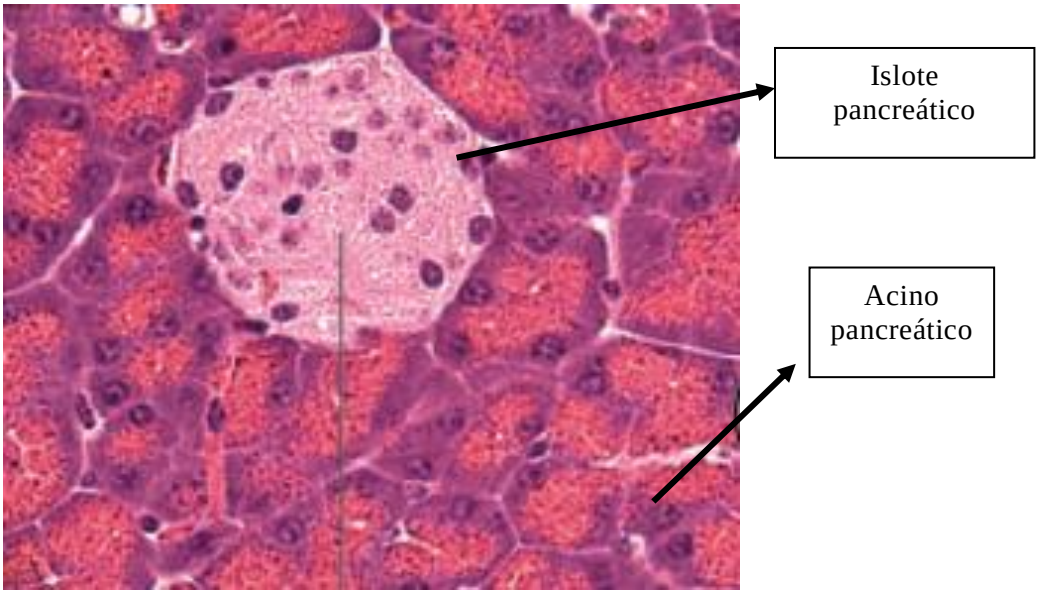


Figura 3:Dibujo de un corte histológico del páncreas. Modificado de (Omary y cols, 2007).

4.1.4.1 Páncreas endocrino:

Islotes pancreáticos o de Langerhans: participan en el metabolismo de los hidratos de carbono mediante la síntesis y liberación de insulina y glucagón. También secretan otras hormonas como somatostatina y polipéptido pancreático.

Se distribuyen entre los acinos pancreáticos, separados de estos por una delgada capa de fibras reticulares, formando islas de células endocrinas, de morfología esférica u ovoide, que vierten su secreción a una red interna de capilares fenestrados, y se disponen formando cordones irregulares anastomosados.

Células del páncreas endocrino:

- *Células A o α:* se localizan en la periferia del islote y son las encargadas de secretar glucagón. Son células de morfología irregular y núcleo esférico y representan hasta el 20% del total de células del islote pancreático.

- *Células B o β:* se encargan de secretar insulina, son las más abundantes y se encuentran distribuidas por todo el islote aunque predominan en la zona central en el caso de los rumiantes y en la periferia en los équidos. Sus gránulos de secreción tienen una morfología muy heterogénea.

- *Células D o δ:* son relativamente escasas, de morfología alargada y distribuyen por todo el islote. Son las encargadas de secretar somatostatina y tienen la característica de poseer una función paracrina que se encarga de inhibir la secreción de glucagón e insulina.

- *Células F:* representan sólo el 2% de las células del islote de Langerhans y se encargan de secretar polipéptido pancreático.

- *Células C:* no tienen gránulos de secreción. Se cree que son células precursoras de las otras células granulares (Redondo, 2013)

4.1.4.2 Páncreas exocrino

El páncreas exocrino es una estructura glandular acinosa ramificada, con la función de sintetizar y segregar sustancias que participan en la digestión del alimento en el duodeno.

Su unidad estructural y funcional es el acino pancreático, con morfología esférica, que se compone de células acinosas y centroacionosas. Estas células se distribuyen alrededor de la luz acinar y están rodeadas por tejido conectivo, el cual se continúa con el tejido que rodea el epitelio de los conductos, manteniéndose unidos los distintos acinos y formando una red similar a los racimos de uva (Gázquez y cols, 2009). Estas unidades funcionales se agrupan en lóbulos pancreáticos. En éstos, los conductos de cada acino se unen para formar los conductos intralobulares que a su vez se agrupan en conductos interlobulillares y por último forman el conducto pancreático principal que desemboca en el duodeno tras haberse unido al colédoco principal (que trae la bilis procedente del hígado y vesícula biliar) por el esfínter de Oddi. No existe una clara división entre la parte exocrina y endocrina, encontrándose los islotes de Langerhans distribuidos por todo el tejido acinar.

- Células acinosas: son las células mayoritarias, ocupando aproximadamente un 85% del volumen del órgano (Williams, 2017). Presentan una morfología troncopiramidal, con la base mayor hacia la membrana basal y la parte más estrecha hacia la luz del acino. Alta basofilia en zona basal y acidofilia en la apical. Núcleo esférico. Como otras células secretoras, presenta un gran retículo endoplasmático rugoso en todo el polo basal (basofilia), en este también observamos el núcleo, y gránulos de zimógeno en el polo apical, cuyo número varía, observándose un gran aumento en ayuno. Entre el núcleo y el polo apical se encuentra el complejo de Golgi. (Figura 4).

- Células centroacinosas: Son menos numerosas que las anteriores. Se trata de células epiteliales aplanadas en la zona central del acino, con apenas organoides y un citoplasma claro, y que constituyen el comienzo del conducto excretor. Tienen función de revestimiento.

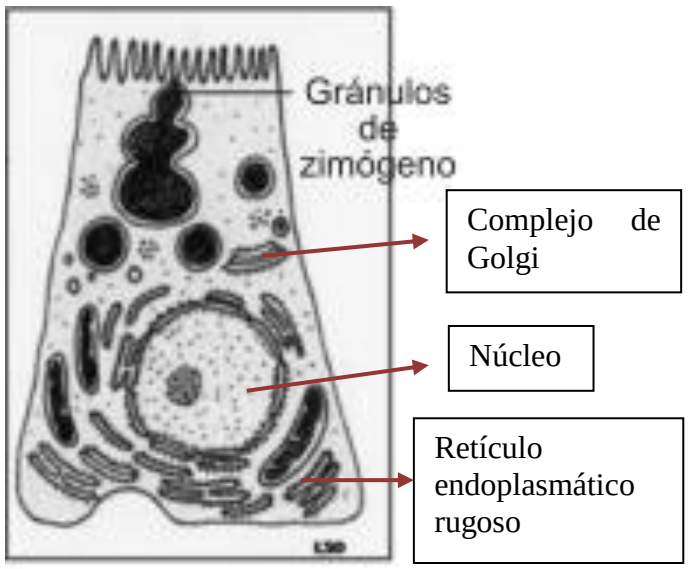


Figura 4: Dibujo de la estructura de una célula acinar. Modificada de Sastre y cols, 2005.

4.1.5. Fisiología

El páncreas es un órgano con doble función:

- Exocrina, llevada a cabo por los acinos pancreáticos que producen el jugo pancreático con funciones digestivas, como ya se ha mencionado.

- Endocrina, basada en la secreción de hormonas por los islotes de Langerhans (insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático).

En los acinos pancreáticos encontramos tres tipos de células cuyas funciones son algo diferentes (Figura 5):

- Células acinares, que sintetizan, almacenan y secretan enzimas digestivas.

- Células centroacinares, que se encuentran en el acino pero en las inmediaciones del nacimiento del conducto y secretan fundamentalmente electrolitos y agua.

- Células ductales, que forman la pared del conducto y cuyo papel principal es la secreción de fluido y electrolitos.

Entre todas estas células encontramos células epiteliales cilíndricas secretoras de mucus.

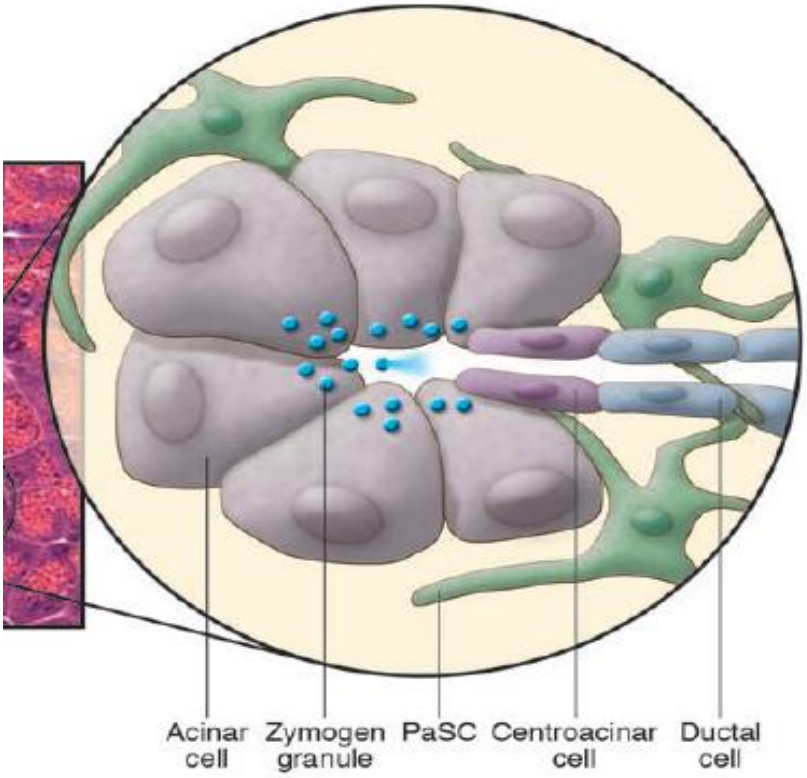


Figura 5: Dibujo esquemático de la estructura de un acino pancreático. Modificado de Omary y cols, 2007.

Como resultado de las secreciones de todas estas células se genera el jugo pancreático, de color transparente, isosmótico con el plasma y con un pH alrededor de 8.

Los principales componentes iónicos del plasma son Na^+, K^+, Cl^- y CO_3H^-. Siempre se cumple que $[Cl^-] + [CO_3H^-] = [K^+] + [Na^+]$. (Figura 6).

La secreción hidroelectrolítica se fabrica gracias a la existencia de la enzima anhidrasa carbónica en las células ductales, de tal modo que el CO_2 producido durante el metabolismo celular se hidrata para formar ácido carbónico (CO_3H_2) que se disocia en H^+ y CO_3H^-. El H^+ se bombea a la sangre intercambiado por Na^+ gracias a un transporte activo secundario. La concentración de Na^+ en el interior celular se mantiene baja por acción de la ATPasa Na^+/K^+. El CO_3H^- es bombeado activamente hacia la luz del conducto. Se cree que el K^+ y el Cl^- pasan pasivamente a la luz del conducto siguiendo sus gradientes electroquímicos, mientras que el Na^+ sería bombeado activamente por una ATPasa situada en la membrana luminal de la célula. Como consecuencia del paso de iones a la luz, se produce un arrastre osmótico de agua. Cuando aumenta la velocidad de secreción la $[CO_3H^-]$ aumenta y la $[Cl^-]$ disminuye, como consecuencia del transporte acoplado entre el CO_3H^- y el Cl^-. La principal misión de esta secreción hidroelectrolítica es neutralizar el quimo ácido que llega al duodeno procedente del estómago y proporcionar un pH alcalino apropiado para la actuación de las enzimas digestivas pancreáticas (Jun y cols, 2017).

Aparte del moco, el jugo pancreático está compuesto por enzimas que son sintetizadas en las células acinares. Estas enzimas se sintetizan en forma inactiva (como zimógenos; de gran importancia para evitar la autodigestión de la propia glándula) y además son empaquetadas en gránulos secretores. Puesto que el paso de formas inactivas a sus formas activadas se produce por actuación de una de estas enzimas, la tripsina, uno de los componentes de la secreción pancreática es un inhibidor de tripsina, con lo que se evita una posible activación enzimática y la autodegradación de la glándula.

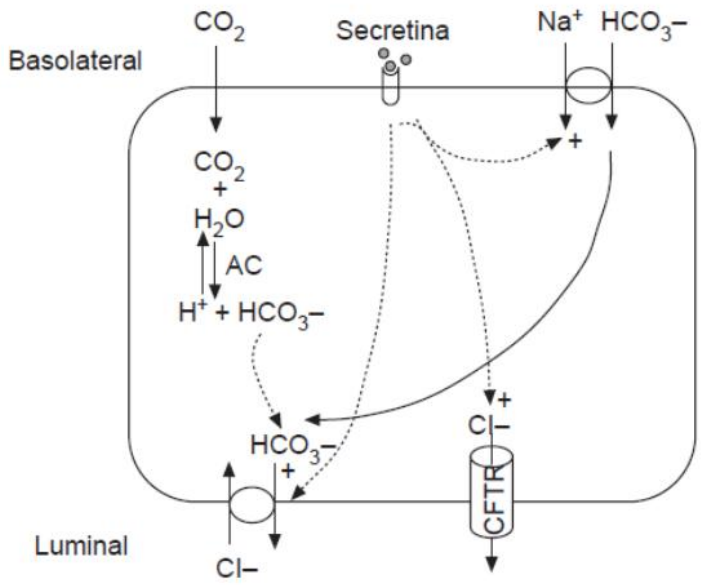


Figura 6: Mecanismo de secreción hidroelectrolítica en las células ductales del páncreas. Efecto de la secretina. AC: anhidrasa carbónica. CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. (Sastre y cols, 2005).

Las enzimas pancreáticas se comportan como hidrolasas, cuya clasificación se realiza de acuerdo con el tipo de moléculas que son capaces de hidrolizar. Estas enzimas tienen pH óptimos de actuación cercanos a 8, por lo que es importante la presencia de CO_3H^- como componente hidromineral de la secreción pancreática. Existen cuatro grupos de enzimas:

1.- Enzimas lipolíticas, entre las que destacan la lipasa, colipasa y fosfolipasa A2. Su misión es hidrolizar lípidos (triglicéridos la lipasa y fosfoglicéridos la fosfolipasa A2).

2.- Enzimas glucolíticas: de las que destaca la alfa-amilasa, uno de los principales componentes del jugo pancreático. Hidroliza uniones alfa 1-4 en el almidón.

3.- Enzimas proteolíticas. Dentro de estas tenemos endopeptidasas, que rompen proteínas en posiciones interiores de la cadena de aminoácidos como son la tripsina, quimotripsina y elastasa. Todas ellas se secretan en forma inactiva (tripsinógeno, quimotripsinógeno y proelastasa) y son activadas por la tripsina, que a su vez es activada por parte de la enteroquinasa, enzima situada en las microvellosidades de células epiteliales duodenales.

También existen exopeptidasas que catalizan la hidrólisis de aminoácidos carboxilos terminales, como las carboxipeptidasa.

4.- Enzimas nucleolíticas, que hidrolizan enlaces fosfodiéster del RNA y DNA (Sastre y cols, 2005).

4.1.5.1. Control de la secreción pancreática

La secreción pancreática está mediada a través de una compleja interacción mecanismos de control nervioso, control humoral y control paracrino (Singer y Niebergall-Roth, 2009).

Es llevada a cabo por un conjunto de mediadores o primeros mensajeros que actúan sobre sus receptores en las membranas de las células pancreáticas, tanto en sus funciones estimuladoras como inhibidoras. Las células pancreáticas se activan y generan una serie de señales intracelulares que van a desencadenar una cascada metabólica, denominada acoplamiento estímulo-secreción que a su vez va a dar lugar a la respuesta celular (Petersen, 2009).

A) Control nervioso:

El sistema nervioso vegetativo parasimpático (nervios vagos y esplénicos) es un estimulante de la secreción enzimática e hidromineral, así como el simpático provoca una inhibición del mismo.

Como dijimos anteriormente el nervio vago es el principal elemento colinérgico que actúa sobre la secreción del páncreas exocrino y sus neurotransmisores más destacados son la acetilcolina (ACh) y el VIP (péptido intestinal vasoactivo).

- Acetilcolina: Su función se manifiesta en el acino pancreático a través de la activación de receptores muscarínicos localizados en la membrana celular (Chey y Chang, 2001). Éstos receptores activan la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP_2), que por una parte conduce a la producción de inositol 1,4,5-

trifosfato (IP_3), el cual se va a encargar de movilizar el Ca^{2+} intracelular, y por la otra de diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína cinasa C (PKC) (Pandol y cols, 1985). Entre los efectos que ocasiona en el páncreas exocrino encontramos, la activación de la síntesis de enzimas pancreáticas y la activación de la secreción de enzimas digestivas (Phillips y cols, 2010).

- Péptido intestinal vasoactivo (VIP): Provoca un aumento del flujo sanguíneo del páncreas por vasodilatación (Konturek y cols, 1989) y también es un mediador de la secreción fluida pancreática y de bicarbonato.

B) Control hormonal:

En cuanto al control hormonal son dos las principales hormonas que controlan la secreción en respuesta a la comida, secretina y colecistokinina:

- Secretina: hormona polipeptídica (27 aa´) secretada por las células "S" de la mucosa duodenal en respuesta a la acidificación. Su principal acción es estimular un fluido copioso rico en CO_3H^- y pobre en enzimas y Cl^-, ya que estimula fundamentalmente las células ductales. También se libera, aunque en menor medida, en respuesta a la presencia de grasas y bilis (Chey y Chang, 2003).

- Colecistokinina o CCK: que se libera también en el duodeno con la presencia de productos de degradación de grasa, proteína y polisacáridos, y en menor medida por la acidificación duodenal (Chandra y Liddle, 2015). Estimula principalmente a las células acinares activando la hidrólisis del PIP_2, que induce la producción de IP_3 y DAG que respectivamente se van a encargar de movilizar el Ca^{2+} intracelular y activar la PKC (Pandol y cols, 1985), provocando la secreción de un jugo pancreático rico en enzimas.

C) Control paracrino:

El control paracrino en el páncreas depende principalmente de la histamina. Ésta es una hormona localizada en el páncreas que es liberada en grandes cantidades en el jugo pancreático. La respuesta secretora de esta hormona se da a través de la activación de los receptores H1 y H2 en las células acinares pancreáticas, lo que lleva a un aumento de los niveles de AMPc (Salido y cols, 1999). Recientemente se ha descrito que los receptores H3 también juegan un papel importante en la regulación de la secreción pancreática exocrina (Nakamura y cols, 2014).

Además de éstos existen otros péptidos que controlan la secreción como son el polipéptido pancreático, gastrina (respuesta similar a CCK), péptido inhibidor gástrico (GIP).

Estos reguladores actúan de una forma coordinada para que en respuestas a la comida se produzca una adecuada liberación de jugo pancreático que asegure el proceso digestivo.

4.1.5.2 Fases de la secreción pancreática exocrina.

Cuando se produce la ingestión de alimentos hay una verdadera estimulación de la secreción. Se trata de un proceso regulado por influencias tanto estimuladoras como inhibidoras, que contempla una compleja red neuronal, hormonal y con mecanismos de retroalimentación que ayudan a mantener un ambiente óptimo para la digestión de los alimentos (Chandra y Liddle, 2015).

En función de los momentos en los que aparece esta secreción de jugo se puede dividir el proceso de secreción en cuatro fases: cefálica, gástrica, intestinal y postabsorción.

A) Fase cefálica:

Secreción de jugo pancreático (entre el 20 y 50% del total, (Konturek y cols, 1990) antes incluso de que el alimento penetre en la boca, sólo con la visión u olfacción del alimento, si bien el mayor estímulo durante esta fase se produce durante el proceso de masticación. Los mecanismos que estimulan la secreción son mayoritariamente nerviosos, concretamente reflejos vagales. La acetilcolina es el principal neurotransmisor que regula esta fase (Chandra y Liddle, 2015). En esta fase la secreción es rica en enzimas y pobre en bicarbonato, lo que sugiere que las células acinares son las que se encuentran mayormente estimuladas.

B) Fase gástrica:

Es la secreción producida cuando el alimento llega al estómago (alrededor del 10%), aunque los mecanismos mayoritarios son reflejos vagales también hay mecanismos hormonales mediados por la liberación de gastrina. Así, cuando se produce una distensión de cuerpo y fundus del estómago se pone en marcha el reflejo oxintopancreático y se produce una secreción pancreática de reducido volumen pero alto contenido en enzimas. La distensión del antro provoca secreción mediada por reflejo vagal (reflejo antropancreático) pero también se produce ésta como consecuencia de la liberación de gastrina, lo que da lugar a una secreción más copiosa y con más contenido en bicarbonato. En este caso, la secreción también consiste principalmente en enzimas, lo que sugiere que son las células acinares las que se activan en esta fase (Anagnostides y cols, 1984).

C) Fase intestinal:

Cuando el quimo llega a duodeno es cuando más fuertemente se estimula la secreción de jugo pancreático (50-80%). En este caso, aunque puede haber mecanismos reguladores reflejos (nerviosos), los mecanismos reguladores hormonales son los más

importantes. La composición química de los alimentos que entran en el duodeno es el determinante más decisivo del tipo de jugo pancreático que se secreta.

Así, los hidratos de carbono sólo provocan un incremento pequeño y transitorio de la secreción. Los péptidos y aminoácidos, en particular los aminoácidos esenciales, dan lugar a respuestas más intensas y duraderas. Los triglicéridos y ácidos grasos provocan una respuesta máxima.

Estas respuestas se deben fundamentalmente a la CCK liberada por estos componentes de los alimentos, pero además la acidificación del duodeno y ciertos ácidos grasos y la bilis, estimula la secreción hidroelectrolítica como consecuencia de la estimulación de la liberación de secretina desde de las células "S" en la mucosa del duodeno hacia la sangre (Konturek y cols, 1969). La secretina va a regular la liberación de bicarbonato desde las células ductales del páncreas, pero también tiene acción sobre las células acinares y potencia la secreción de enzimas pancreáticas (Singh y Pearson, 1984).

La CCK va a estimular la secreción enzimática y a reforzar los reflejos enteropancreáticos vago-vagales que se van a proyectar en el páncreas y van a activar la secreción de bicarbonato pancreático (Singer y Niebergall-Roth, 2009)

En esta fase se estimulan tanto las células acinares pancreáticas como las células ductales, con lo cual se observa en esta fase tanto secreción hidroelectrolítica (bicarbonato) como enzimática (Anagnostides y cols, 1984).

D) Fase postabsorción:

Una vez los nutrientes se han absorbido desde la luz intestinal, estos pueden estimular directamente la secreción de las células acinares pancreáticas o bien pueden activar indirectamente vías hormonales y neuronales que regulen la secreción pancreática exocrina (Liddle, 2012). Se cree que los nutrientes absorbidos son capaces de estimular la síntesis de nuevas enzimas digestivas para reponer su suministro en el páncreas. El papel exacto que desarrollan los nutrientes en estas complejas vías aún no

está claro del todo y hacen falta estudios adicionales para conocer a fondo sus efectos (Chandra y Liddle, 2015).

Se ha demostrado que el mayor papel en la secreción pancreática exocrina es llevado a cabo por la estimulación del nervio vago y por la gastrina en las fases cefálica y gástrica, mientras que en la fase intestinal predomina la estimulación del nervio vago en conjunto con la colecistokinina y la secretina (Konturek y cols, 2003).

4.1.5.3 Vías de señalización intracelular

Ante un determinado estímulo en las células se genera una señal intracelular que da lugar a la respuesta celular. Existen varias vías por las que se generan estas señales intracelulares. Entre ellas encontramos la vía del calcio (Ca^{2+}) y el diacilglicerol (DAG), la vía del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y otras como pueden ser las tirosinas cinasas.

A) Vía del calcio y el diacilglicerol (DAG):

El ion calcio (Ca^{2+}) es uno de los segundos mensajeros más importantes que se conocen. Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular están implicados en la regulación de muchos procesos celulares (Camello-Almaraz y cols, 2002) como la contracción del músculo liso (Rembold, 1992), la secreción (Brown y cols, 1985) la diferenciación celular (Buonanno y Fields, 1999) y la apoptosis (Smaili y cols, 2000).

Señales de Ca2+:

Para que el Ca^{2+} actúe como señal se requiere un incremento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. En reposo la concentración en el interior es menor (10^{-7}) que en el medio extracelular (10^{-3}) y un aumento excesivo de ésta puede llegar a producir muerte celular por necrosis o apoptosis (Smaili y cols, 2000).

Las señales de calcio no se basan simplemente en un aumento sostenido de los niveles intracelulares, sino que también se observan incrementos transitorios llamados oscilaciones. Este descubrimiento ha sido posible gracias a la monitorización mediante la utilización de sondas fluorescentes sensibles a Ca^{2+}:

- Oscilaciones: Consisten en liberaciones de Ca^{2+} repetitivas, de corta duración y frecuencia variable. Pueden ser globales, propagándose por toda la célula en forma de ola de Ca^{2+}; o locales, en la que la señal de Ca^{2+} queda confinada al polo apical o secretor (Thorn, 1993). Ocurre frente a estimulaciones con concentraciones fisiológicas y sería la señal fisiológica de Ca^{2+} en los acinos pancreáticos (Berridge, 1990; Yule y Gallacher, 1988) (Figura 7).

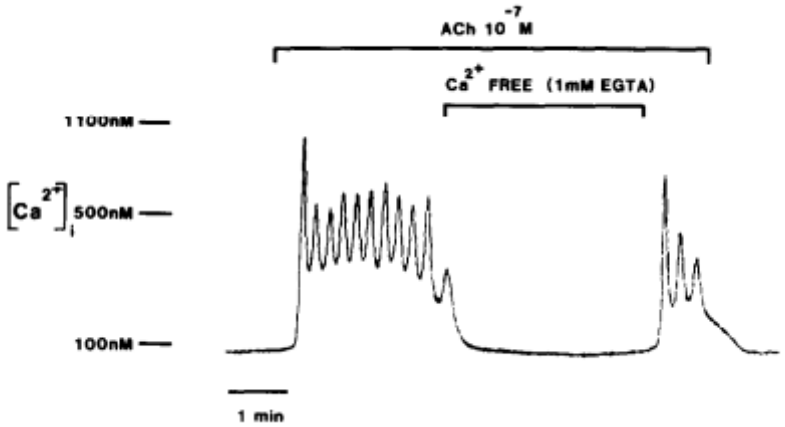


Figura 7: $[Ca^{2+}]$, medido en una sola célula acinar pancreática superfundida a 30 ° C. ACh (10^{-7} M) ha inducido cambios oscilatorios en la $[Ca^{2+}]_i$. (Yule y Gallacher, 1988).

- Elevaciones globales y sostenidas: Consisten en una rápida liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares hacia el citosol así como una entrada desde el medio extracelular, seguida de una vuelta al estado inicial. Se observan frente a estimulaciones con concentraciones elevadas (Yule, 2015). (Figura 8).

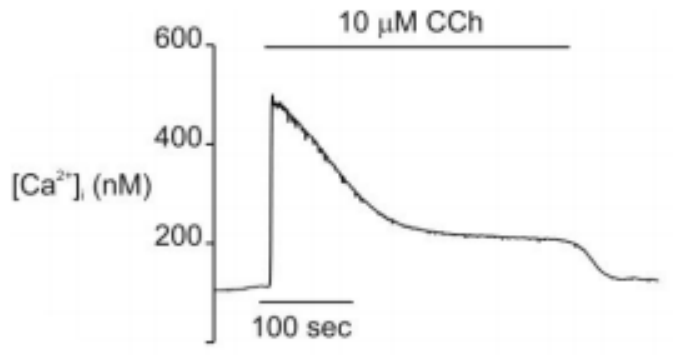


Figura 8: Cambios en $[Ca^{2+}]_i$ provocados por concentraciones máximas de secretagogos en células acinares individuales. Se observa un aumento brusco de $[Ca^{2+}]_i$ que posteriormente disminuye a un nuevo nivel de meseta. (Yule, 2015)

Mecanismos que controlan la señal de Ca^{2+}:

La membrana plasmática es impermeable al Ca^{2+}, y existe gran diferencia entre las concentraciones existentes entre los compartimentos intracelular y extracelular. Esto convierte al Ca^{2+} en elemento ideal para la señalización celular.

Además, puesto que el calcio no es producido ni destruido, es la propia célula la que controla los niveles intracelulares mediante canales que liberan Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y canales que permiten la entrada desde el medio extracelular.

- Liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares: El retículo endoplásmico es un importante almacén de Ca^{2+} (Pozzan y cols, 1994). La liberación de éste puede producirse a través de varios tipos de canales, entre ellos los canales receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3).

- Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular: Se produce a través de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana celular (Lim y cols, 2008). (Figura 9).

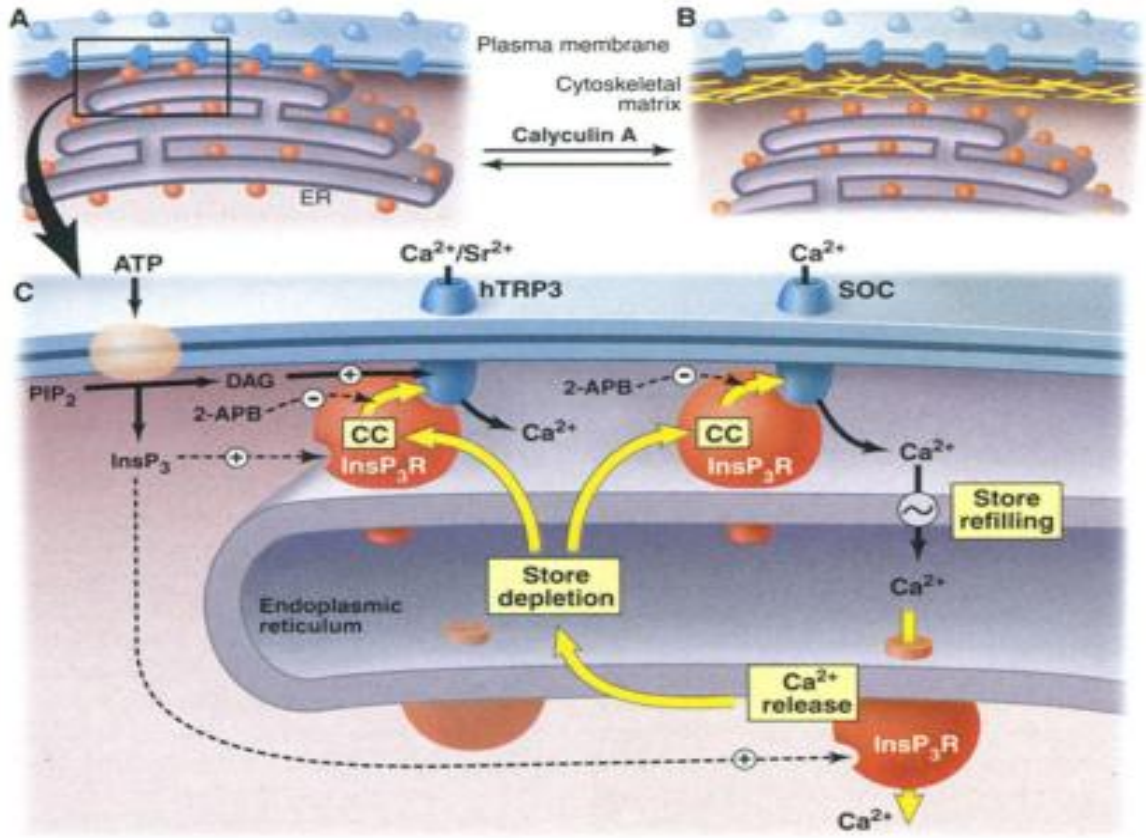


Figura 9: Esquema del mecanismo de acoplamiento para la regulación de la entrada de Ca^{2+} en las células. (A) El retículo endoplasmático (ER) contiene el receptor de inositol trisfosfato (InsP3R) (rojo), que interactúa con los canales SOC en la membrana plasmática (azul). (B) Después de la adición del inhibidor de la fosfatasa calyculin A, se forma una matriz densa del citoesqueleto justo debajo de la membrana plasmática, que desplaza el ER y altera la interacción molecular entre los SOC y los InsP3R. (C) El vaciado de las reservas internas de Ca^{2+} en el ER genera un cambio conformacional (CC) en los lnsP3R que se combinan con los SOC. (Berridge y cols, 2000)

B) Vía del AMPc:

El AMPc es un segundo mensajero intracelular sintetizado a partir del ATP por la enzima adenilato ciclasa, localizada en la membrana celular. Su producción es estimulada por la activación de los receptores de VIP y secretina (Sastre y cols, 2005). (Figura 10).

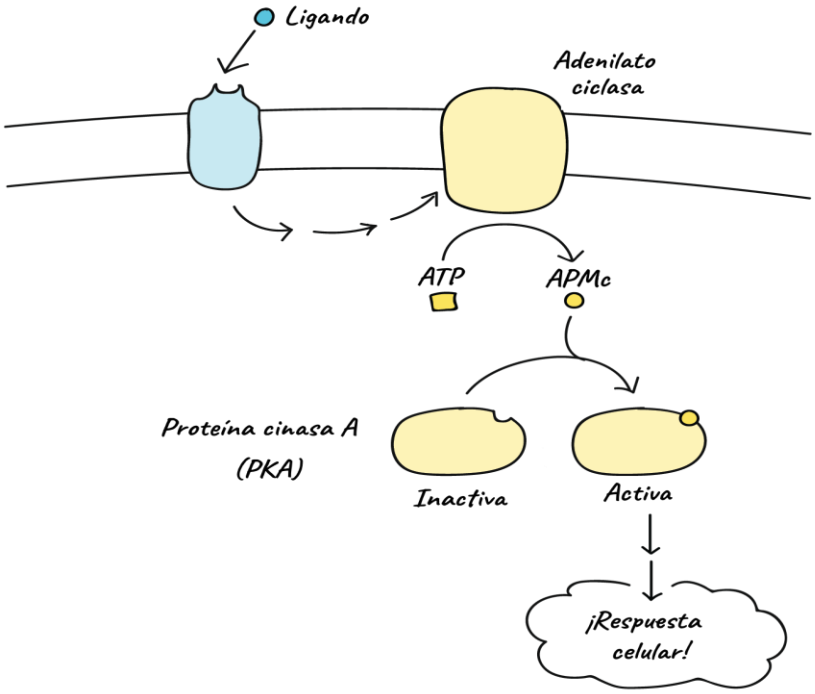


Figura 10: Mecanismo de activación de la vía AMPc. Fuente: https://es.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling

C) Proteínas cinasas (PK):

Estas modifican otras proteínas mediante fosforilación. La fosforilación reversible es fundamental en muchos procesos celulares. Además, estas proteínas forman parte de las cascadas de señalización en la que existen modificaciones en las concentraciones de Ca^{2+}, DAG, AMPc y calmodulina (Flores-Vieyra y cols, 2005). En especial las proteínas cinasas activadas por mitógenos constituyen una de las vías de señalización más importantes y estudiadas, por estar implicadas en procesos proliferativos, de diferenciación celular, expresión génica, migración celular, crecimiento, muerte celular, apoptosis y respuesta inmunitaria (Dong y cols, 2002).

4.2. CÉLULAS ESTRELLADAS DEL PÁNCREAS

Las células estrelladas pancreáticas (PSC), en el órgano sano, comprenden alrededor del 4% de todas las células del órgano (Masamune y cols, 2008), son parecidas a los miofibroblastos y se encuentran entre los acinos pancreáticos. Su función está regulada por estímulos autocrinos y paracrinos, y comparten muchas características con las células estrelladas hepáticas.

La activación de PSC les induce a proliferar, migrar a sitios de daño tisular, se contraigan y, posiblemente, fagociten y sinteticen componentes de una matriz extra celular (MEC) para promover la reparación del tejido. Pero la activación sostenida de estas tiene un papel en la fibrosis pancreática, desencadenada en enfermedades como pancreatitis crónica y cáncer de páncreas. De ahí la importancia sobre el conocimiento de la biología de estas células (Ferdek y Jakubowska, 2017).

4.2.1. Historia:

En 1876 se describen por primera vez las células estrelladas hepáticas por Karl von Kupffer, como *"Sternzellen"* (estrellas), "endoteliales fagocíticas". Estas células no son únicas de hígado y páncreas, sino que también se encuentran en riñón (Liu, 2006) y pulmón (Keane y cols, 2005).

En un estudio realizado en 1982 por Watari y cols. se expone la presencia de una gota lipídica en el interior de una célula en el páncreas, y se produjo la identificación de estas células. Para ello se administró vitamina A, la cual provocó una reacción de autofluorescencia observada mediante microscopía electrónica, al acumularse en estas gotas lipídicas.

En 1997, Saotome y cols. describen el aislamiento de células periacinares similares a fibroblastos a partir de páncreas humano. Estas células presentaban características de miofibroblastos activados, como la expresión de actina α de músculo

liso y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. Un año más tarde, Bachem y cols. y Apte y cols. (1998) encontraron que estas células presentan similitudes morfológicas y bioquímicas con las células estrelladas hepáticas, descritas por Watari, y se pueden aislar a partir de páncreas humano y de rata.

4.2.2. Estructura/Descripción:

Las PSC pueden estar presentes en el espacio periacinar, perivascular y periductal. Morfológicamente presentan una forma estrellada, de ahí su nombre, con unas prolongaciones citoplasmáticas largas que rodean la base del acino. (Figura 11).

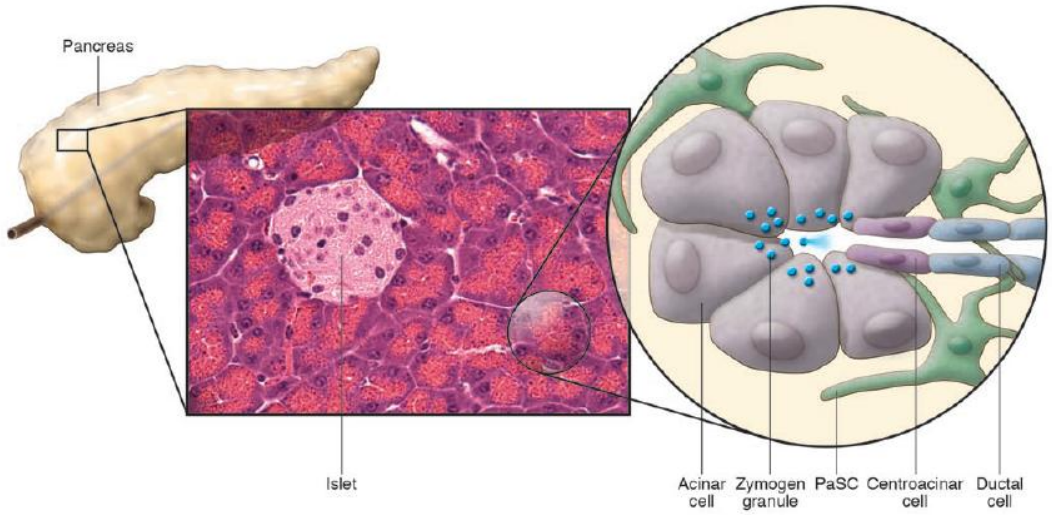


Figura 11: Esquemática de los componentes celulares del páncreas exocrino. Presencia de células estrelladas (color verde) en los espacios periacinar y periductal. (Omary y cols, 2007)

La célula inactiva presenta un fenotipo de almacenamiento de grasa, en forma de gota lipídica con retinol y ésteres de ácidos grasos. En el paso hacia una célula activa, sintética de tipo miofibroblástica, se produce una pérdida de esta gota lipídica.

Presentan también proteínas del citoesqueleto como desmina y proteína glial fibrilar ácida, entre otras.

4.2.3. Fisiología:

Las PSC se encuentran en el punto de mira de muchos investigadores por su participación en la patobiología de los principales trastornos del páncreas exocrino, tanto pancreatitis crónica como cáncer de páncreas. En ellos estas células pasan de un estado de reposo a un estado activado sostenido.

La función de principal de las células estrelladas del páncreas consiste en migrar a sitios de daño tisular, contraerse, proliferar, fagocitar y crear una matriz que rodee al órgano y facilite así su reparación. Esta matriz se crea gracias a la activación de las células puesto que en estado fisiológico se encuentra inactivas. El problema radica cuando este proceso se cronifica, hay una activación persistente, las células no se inactivan y el órgano acaba fibrosándose, en lugar de producirse una rediferenciación a un estado de reposo o a un proceso de apoptosis.

Desde este punto de vista, la fibrosis pancreática puede ser definida como los cambios patológicos en la composición de la matriz extra celular (MEC) en el páncreas, tanto en la cantidad como la calidad, siendo resultado de la activación perpetuada de PSCs.

4.2.3.1. Propiedades:

a) Expresión de proteínas:

Las PSC expresan proteínas de filamentos intermedios de desmina (caracterización de miocitos), vimentina (caracterización de leucocitos, fibroblastos y células endoteliales), nestina (caracterización de células madre neuroepiteliales) y proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (caracterización de astrocitos) que, junto con la presencia de gotas de grasa intracelular, sirven para distinguir PSC del resto fibroblastos normales (Apte y cols, 1998; Bachem y cols, 1998).

La expresión de esta variedad de proteínas de filamentos intermedios hace que presenten varias propiedades potenciales, incluyendo la contractilidad, el potencial para

elaborar componentes de MEC, el potencial de proliferar y la presencia de extensiones celulares para detectar su entorno.

Así, la contracción de PSC puede estar implicada en la regulación del tono vascular ductal en el páncreas.

b) Mantenimiento de la quiescencia:

Por otro lado, la presencia de retinoides en el citoplasma de la célula va a ejercer un efecto antagonista a su activación, manteniendo la célula quiescente, gracias a la unión con sus receptores nucleares y la regulación de la expresión génica (Chelstowska y cols, 2016). McCarroll y cols, (2006) mostraron que el retinol y sus metabolitos inhiben la inducción de expresión α-SMA en PSCs. Así, se podría especular que la perdida de retinoides en la activación de estas células no es una casualidad, sino un requisito fundamental.

En condiciones de salud, nos encontramos una célula inactiva, en reposo, con la presencia de desmina, GFAP y gotas de grasa intracelular. En la célula activa, desaparecen estas gotas y se produce una sobreexpresión de α-SMA y proteínas de la matriz extracelular (colágeno tipo I, tipo III y fibronectina).

c) Regulación de la matriz extracelular:

Estas células, además de ser una fuente de proteínas para la matriz, generan enzimas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), que degradan la matriz y sus inhibidores (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz, TIMPs), es decir, participan en la regulación y recambio de la matriz en el páncreas sano.

d) Inmunidad local:

Las PSC pueden realizar endocitosis y fagocitosis de cuerpos extraños, sugiriendo que pudiera desempeñar un papel en las funciones inmunes en el páncreas. También se especula sobre su función en la inmunidad innata, puesto que expresa diferentes receptores "Toll-like" (TLRs): TLR-2 (reconoce patrones moleculares de bacterias Gram +), TLR-3 (reconoce dobles cadenas de ARN durante la replicación

viral), TLR-4 (reconoce lipopolisacáridos de la pared de bacterias Gram -) y TLR-5 (reconoce la flagelina de los flagelos bacterianos) (Masamune y cols, 2008).

e) Angiogénesis:

Otra función nueva que recientemente identificamos en PSC está relacionada con la angiogénesis. Estas células producen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) sobre todo en condiciones de hipoxia (Masamune y cols, 2008).

f) Regulación del tono vascular:

Debido a la localización periductal y perivascular, estas células pueden regular el tono vascular y ductal del páncreas mediante la expresión de α-SMA, provocando un aumento del potencial contráctil.

4.2.3.2. Matriz extracelular:

En todos los tejidos la MEC actúa separando compartimentos tisulares y además está implicada en procesos de proliferación, migración y supervivencia. Existen dos tipos de MEC:

- Membrana basal que actúa impidiendo el movimiento de moléculas solubles.
- Matriz intersticial que aporta flexibilidad y elasticidad a los tejidos y está subyacente a la membrana basal (Yurchenco y Patton, 2009).

En el órgano sano, la estructura se mantiene gracias al equilibrio existente entre la síntesis y degradación de la MEC; sin embrago, frente a estados patológicos se observa una ruptura de este equilibrio, síntesis excesiva de proteínas de la matriz y desarrollo de fibrosis (Hansen y cols, 2015).

Las PSC son la fuente predominante de proteínas de la matriz extra celular. La capacidad de estas células para la formación de la MEC fue estudiada por Robinson y

cols, (2016). Los autores califican el grado de remodelación de la MEC mediante la cuantificación de la densidad de colágeno. Se confirmó el papel de estas células en la remodelación de la matriz extracelular por el aumento de la contracción de la matriz, aumento en la alineación y espesor de las fibras de colágeno.

Además, como hemos señalado, existen las denominadas metaloproteinasas de MEC (MMP), cuya función es degradar la totalidad de los componentes de la MEC. Estas se sintetizan como zimógenos inactivos y son activados en el espacio extracelular. También existen los denominados inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de MEC (TIMPs) que reducen la degradación excesiva de los componentes de la MEC (Johnson y cols, 1998; Tjomsland y cols, 2016).

Para que se produzca el depósito de MEC, las PSC producen metaloproteinasas, concretamente MMP-2 y MMP-9, que son capaces de destruir la matriz normal, colágeno IV y V, gelatina y elastina (Johnson y cols, 1998), favoreciendo la deposición de colágeno fibrilar (I y III) y fibronectina (Yokota y cols, 2002). Además, Haber y cols, en 1999, establecieron que el colágeno tipo I es la proteína de la MEC mayoritaria en áreas fibróticas, que estas áreas son positivas para α-SMA, es decir, que hay PSC activas en esa zona y, se ha comprobado, que estas células expresan ARNm de colágeno tipo I, por lo que se supone que éstas son la fuente principal del mismo en áreas fibróticas.

Liu y cols, 2016, estudiaron la relación entre las células estrelladas del páncreas y la formación de la matriz, resultando en un bucle continuo, es decir, una mayor cantidad de células activadas resultó en un matriz cada vez más rígida que conducía a una mayor activación de células.

La sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) se asocia a un aumento en la deposición de MEC en paralelo con el desarrollo de la fibrosis. Además, Ohnishi y cols, (2004) revelaron que el TGF-β1 estimula la activación de estas células por el aumento de la expresión de α-SMA.

Esta fibrosis se observa tanto en la pancreatitis crónica como en el cáncer de páncreas. La sustitución progresiva de los tejidos del páncreas por tejido conjuntivo va a dar lugar a una insuficiencia, en primer lugar, exocrina y endocrina del órgano.

4.2.3.3. Activación de las células estrelladas del páncreas:

En su cambio de estado, en estas células se observan una serie de modificaciones como son un cambio de fenotipo, pierden los gránulos de vitamina A, expresan actina alfa de músculo liso (α-SMA), aumenta su proliferación y migración, producen grandes cantidad de colágeno fibrilar y fibronectina, degradan la matriz normal mediante la liberación de metaloproteinasas (MMPs) y liberan citoquinas.

a) Cambio de fenotipo:

El indicador del cambio de fenotipo en PSC es la expresión de α-SMA. Se trata de una proteína del citoesqueleto con carácter contráctil. Cuando las PSC expresan esta proteína indica que ha adquirido un fenotipo miofibroblástico (Apte y cols, 1998).

b)Proliferación:

Se observa un aumento en la proliferación de las PSC en respuesta a citoquinas, estrés oxidativo y factores de crecimiento (Bachem y cols, 1998). Además, Schneider y cols, 2001, expusieron que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es el principal mitógeno que aumenta la proliferación de las PSC.

c) Migración:

Las PSC migran a aquellos sitios donde existe daño pancreático, para lo que es necesario una activación de las mismas, por lo que si existe migración están activadas.

Factores de activación:

Entre los factores que activan las PSC nos encontramos, fundamentalmente, citoquinas, factores de crecimiento, etanol y sus metabolitos y estrés oxidativo.

a) Citoquinas y factores de crecimiento:

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β, β1, activina A, factor de necrosis tumoral α (TNF-α), interleucina 1 y 6 (IL-1 e IL-6). La fuente principal de estas citoquinas en el páncreas inflamado son los macrófagos activados (secretando TGF-β1), las plaquetas (que contienen PDGF y TGF-β1) y células acinares (TNF-α, IL-1, IL-6). Esto da lugar a una regulación paracrina de la glándula, pero además no debemos olvidar que existe una regulación autocrina, puesto que las células estrelladas del páncreas son capaces, por si solas de sintetizar citoquinas como TGF-β1, activina A e IL-1, además de moléculas proinflamatorias (COX-2) que pueden perpetuar el fenotipo activado.

Por otro lado también se demostró en un ensayo experimental realizado por Hama y cols, en 2004, en el que sugieren que la angiotensina II estimula la proliferación de estas células e induce la contracción celular, debido a una entrada de calcio en la célula.

b) Etanol:

Actúa directamente sobre las células e induce su activación. Éstas responden expresando alcohol deshidrogenasa, lo que indica que son capaces de oxidar el etanol y la generación de su metabolito acetaldehído. Además es posible que este estrés oxidativo en las células contribuya a los efectos profibrogénicos del etanol. Así, tanto el etanol como el acetaldehído promueven la activación y provocan la peroxidación de los lípidos de estas células (Apte y cols, 2000). Por otra parte, la vitamina E, antioxidante, previene la activación de las células ante la inducción del etanol y el acetaldehído (Rickmann y cols, 2007).

c)Estrés oxidativo:

Éste, además de de activar las PSC, contribuye a la síntesis de colágeno fibrilar (Kikuta y cols, 2004). Este estrés puede producirse por diferentes causas, como es el caso del etanol, como hemos comentado, en el que existe una peroxidación lipídica que va a provocar un estrés oxidativo en el interior celular.

Rutas de señalización:

Durante el proceso de activación, se producen cambios dinámicos pero orquestados de la señalización intracelular (figura 12). La identificación de moléculas que regulan esta activación proporcionará un acercamiento para el desarrollo de terapias antiinflamatorias y antifibróticas.

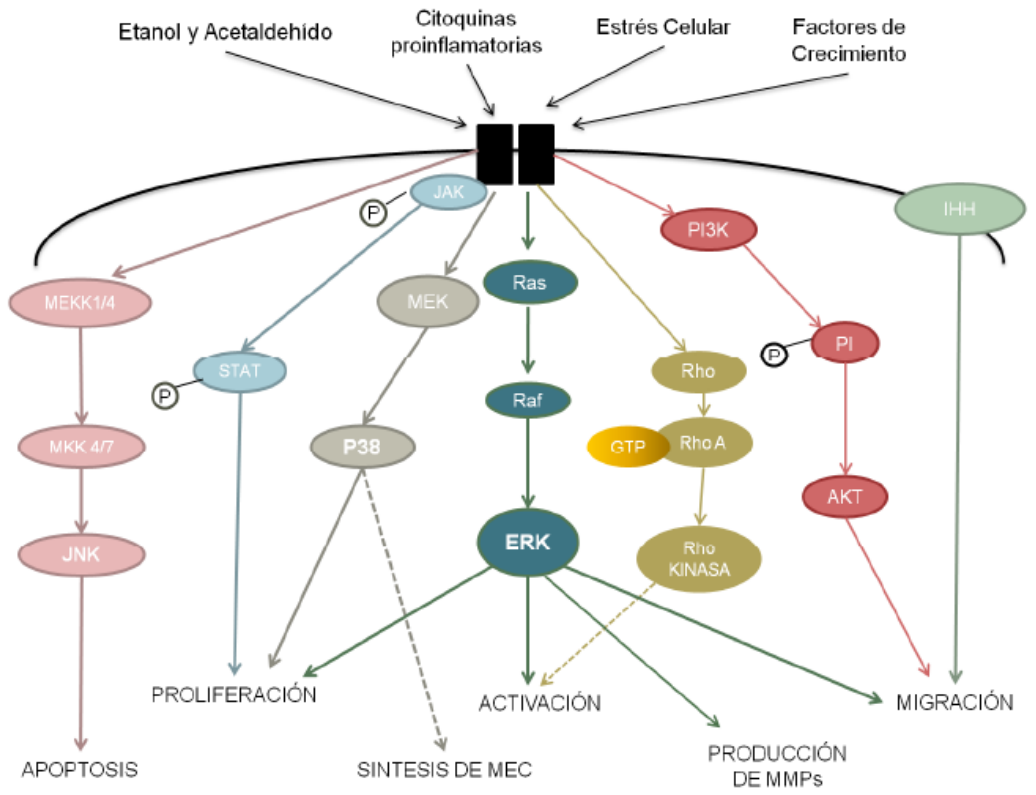


Figura 12: Esquema representativo de las rutas de señalización implicadas en las células estrelladas pancreáticas. (Castiñeira, 2014)

a) PPAR-C:

Receptores activados de proliferación de peroxisomas, subfamilia de receptores nucleares hormonales caracterizados como reguladores del desarrollo de adipocitos y, además, presentan implicaciones en el control de la proliferación celular, fagocitosis e inmunidad (Tontonoz y Spiegelman, 2008). Como hemos comentado anteriormente,

durante la activación celular se pierde aquella gota lipídica citoplasmática, debido a una regulación negativa de la señalización de PPAR-C, hecho por el cual se considera esta vía de señalización fundamental para el mantenimiento de la quiescencia de estas células, inhibiendo la proliferación celular, la síntesis de proteínas de la matriz, la síntesis de colágeno y la expresión de α-SMA (Jaster y cols, 2005; Masamune y cols, 2002).

b) RHO- quinasa:

Durante el proceso de activación se va produciendo la formación de unas fibras de tensión, debido a la reorganización del citoesqueleto (Masamune y cols, 2003). A esta proteína se le ha otorgado el papel regulador de la actina en el citoesqueleto y del cambio de morfología, tras varios experimentos utilizando inhibidores de la misma. Así, con la inhibición de esta vía, las células se mantenían alargadas, fusiformes y con sus procesos dendríticos prominentes, así como un retroceso en la formación de las fibras de tensión y la inactivación de las células. Por lo tanto, esta vía regula la expresión específica de la célula como músculo liso (Yamakawa y cols, 2000).

c) Proteína activadora-1 (AP-1):

AP-1 es un factor de transcripción que participa en la regulación de diferentes procesos celulares, incluyendo la proliferación, la muerte y la inflamación (Karin y cols, 1997). La actividad de esta proteína durante la activación de PSCs fue examinada por Fitzner y cols, en 2004. Ellos mostraron que la activación máxima AP-1 fue observada 2 días después del aislamiento, seguida de una disminución, pero debido a la falta de inhibidores específicos AP-1 no se pudo comprobar si se requiere la activación (o la desactivación) de AP-1 para la transformación. Sin embargo, han mostrado las capacidades de citoquinas (IL-1b y TNF-A), factores de crecimiento (PDGF-BB), el etanol y sus metabolitos, aldehídos, reacción oxidativa, y tripsina para inducir la activación AP-1 en PSCs (Kikuta y cols, 2006).

d) MAP quinasas:

Las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs) son los principales mediadores de las señales de activación de las células estrelladas del páncreas. Se trata de una vía de transducción de señales que, en último lugar, modificará la actividad de las proteínas modulando así la expresión de distintos genes. Está formado por proteínas quinasas específicas de células eucariotas implicadas en gran variedad de funciones biológicas. Entre ellas participan en la expresión de genes, proliferación y supervivencia y muerte celular apoptótica (Chang y Karin, 2001). Esta vía es activada por múltiples estímulos extracelulares. Dentro de esta familia, existen tres elementos principales en la activación de las PSC: ERK (quinasa regulada por factores extracelulares), JNK (c-Jun N-terminal quinasa) y p38, y en la activación, además de AP-1.

ERK precede al aumento de la expresión de α-SMA (Jaster y cols, 2002). Las ERK median la activación, migración y la proliferación de PSC en respuesta a PDGF, uno de los más potentes mitógenos, además de otros estímulos extracelulares como angiotensina II, presión o tripsina (Watanabe y cols, 2004). Además, otra de las funciones reguladas por ERK es la producción de metaloproteinasas de la matriz (MMP-1).

La evidencia de la participación de p38 en la activación de estas células se basa en que inhibidores de la misma impidieron este hecho, en presencia de estimulantes como presión, etanol y acetaldehído (McCarroll y cols, 2003). p38 regula la producción de colágeno en respuesta al etanol, acetaldehído y estrés oxidativo (Masamune y cols, 2003), y la proliferación de PSC fundamentalmente.

La participación de JNK en la activación es menos relevante. La importancia de esta se va a basar en la inducción de la apoptosis en PSC (Dhanasekaran y Reddy, 2008).

e) 3- Fosfatidilinositol quinasa (PI3K):

Se trata de una vía necesaria para la migración de células, que es estimulada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), pero no interfiere en su proliferación (Masamune y cols, 2003).

La activación de esta vía en respuesta a la periostina también media la migración PSC (Erkan y cols, 2007).

f) Janus quinasas (JAK):

Las janus quinasas (JAK) son una familia de proteínas pertenecientes a las enzimas asociadas a receptores de citoquinas. Son tirosinas quinasas no específicas. Forman parte de vías de señalización destinadas a la regulación de la expresión génica. Modulan las actividades de un grupo de factores de transcripción, STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción) (Silva, 2004). Estas proteínas se encuentran de forma latente en el citoplasma, sufren una fosforilación tras la activación por receptores de citoquinas, y se desplazan hacia el núcleo, donde se unen al ADN y modifican la expresión génica. Masamune en 2005 observó que PDGF, además de activar ERK y PI3K, también JAK 2, STAT1 y STAT 3 en PSC.

g) SMAD:

Familia de proteínas que funcionan a nivel celular como segundo mensajero, propagando señales intracelulares que se transducen en acciones extracelulares con la participación de ligandos del factor transformante de crecimiento beta (TGF-β) hasta el núcleo celular donde activan la transcripción de genes.

El TGF-β1 es el regulador más importante en el desarrollo de la fibrosis del páncreas y es mediado y modulado por SMAD. Los SMADs van a ser fosforilados, forman complejos y se trasladan al núcleo para activar la transcripción de genes específicos.

El TGF-β1 regula una variedad de funciones de las PSC, incluyendo la síntesis aumentada MEC, la activación aumentada y la expresión α-SMA, la proliferación atenuada y la expresión reducida de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (Shek y cols, 2002).

Ohnishi y cols, en 2004 examinaron los papeles de SMADs en la regulación TGF-β1 sobre las funciones de PSCs. Ellos mostraron que Smad2, Smad3, y Smad4 era

funcionalmente activos en PSCs. Además, han mostrado varias interacciones entre SMADs y otros senderos señalados.

h) Factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1):

Un entorno de hipoxia en el tumor juega un papel importante en la progresión del mismo y en la pancreatitis crónica (Koong y cols, 2000; Li y cols, 2016). Casualmente Ide y cols, en 2006, afirman que las PSC activas también se encuentran en un entorno similar. Así, PSC, células tumorales y células endoteliales tienen que funcionar en un microentorno de bajo oxígeno. La respuesta celular a esta condición de hipoxia es mediada por el factor de transcripción HIF-1 (Sada y cols, 2016).

Mientras que la proteína HIF-1B se expresada bajo normoxia, HIF-1a es inestable bajo normoxia debido a una degradación de O_2 que es capaz de acumular bajo la hipoxia, trasladar al núcleo, y activa una variedad de genes, como VEGF (Semenza, 2000).

Así, la hipoxia induce la expresión nuclear de HIF-1A, seguido de la producción del gen VEGF en PSC. La activación de HIF-1A implica que las PSC podrían servir como fuentes de oxígeno en el páncreas (Masamune y cols, 2008).

4.2.3.4. Eventos post-activación:

Después de la iniciación de activación, las PSC tienen dos destinos (figura 13):

a) Fibrosis pancreática: Si la inflamación o la lesión son sostenidas o repetidas, perpetuará la activación de PSC, conduciendo al desarrollo de fibrosis pancreática.

b) Apoptosis o desdiferenciación: Por el contrario, si la inflamación y/o lesión son controladas y no se repiten, las PSC podrían sufrir apoptosis o desdiferenciación a su fenotipo quiescente. En este caso, la fibrosis no llegará a desarrollarse, si no que se produce una cicatrización del tejido. McCarroll y cols, en 2006 observaron la desdiferenciación en respuesta a la vitamina A por disminución de la activación de las MAP kinasas. En el caso de la apoptosis ha sido la vitamina E la que induce la muerte

celular programada y autofagia en PSC activadas de rata, sin afectar a PSC quiescentes ni a otras células pancreáticas, según (Rickmann y cols, 2007).

Desde este punto de vista, la fibrosis pancreática puede ser definida como los cambios patológicos de la composición MEC en el páncreas tanto en la cantidad como la calidad, siendo resultado de la activación perpetuada de PSC.

Para el desarrollo de fibrosis pancreática, una lesión repetida y persistente y la inflamación son importantes. Esto está de acuerdo con el concepto de Klöppel y Maillet (1992), sobre la secuencia necrosis-fibrosis-necrosis, que se vio reflejada en episodios de pancreatitis aguda que terminaron conduciendo al desarrollo de fibrosis pancreática.

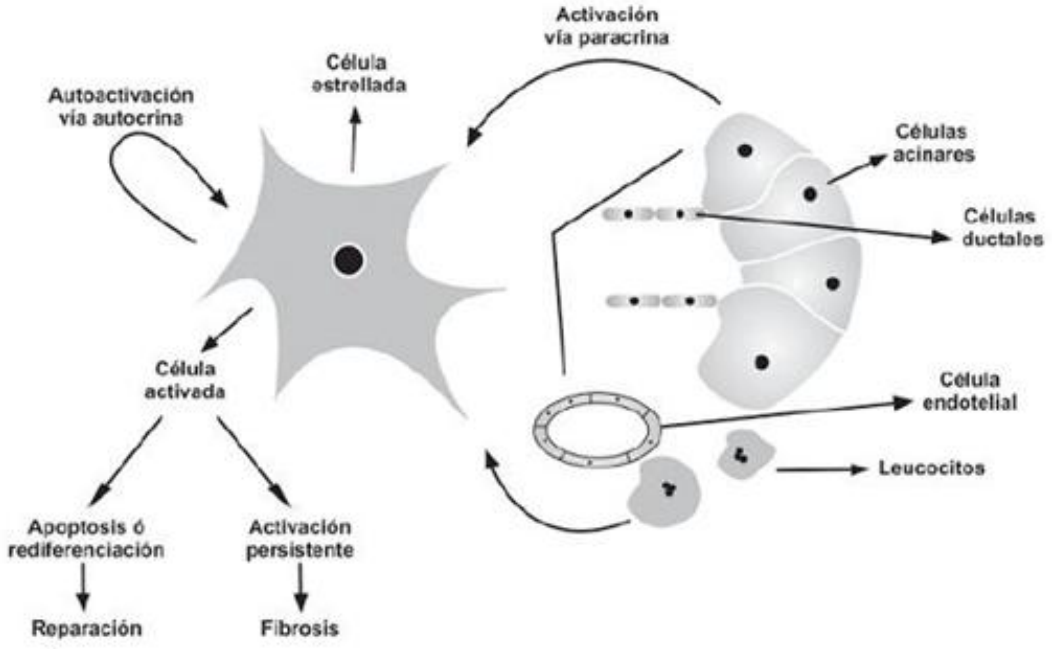


Figura 13: Mecanismos de activación de las PSCs. (Lizarazo, 2008)

4.2.3.5. Importancia del calcio en la fisiología de las células estrelladas del páncreas

Los principales temas de investigación sobre la biología de las células estrelladas del páncreas el último año han sido los aspectos biofísicos de las interacciones PSC-ECM y la fisiología del calcio intracelular (Pang y cols, 2017).

Mecanismos de acción:

El mecanismo de acción de basa en un aumento de la [Ca^{2+}] intracelular, provocando un estímulo en las membranas, orgánulos, proteínas citoplasmáticas, que participan en la transducción de la información en respuestas específicas (Hosfield y cols, 1999). Para ello, en la célula existe una serie de mecanismos que controlan el aumento y disminución de este ión. En relación con aquellos que provocan un aumento, según Berridge y cols. (2000), se encuentran los depósitos intracelulares y/o la entrada desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática. En el caso contrario, para disminuirlo, se encuentra el almacenamiento en el retículo o en las mitocondrias (González y cols, 2000), o la salida del ión del interior celular mediante la bomba Ca^{2+}-ATPasa de la membrana citoplasmática, o por intercambio con el ión sodio.

Canales para la entrada de calcio

Se ha encontrado migración de PSCs en metástasis distantes de PDAC (adenocarcinoma ductal pancreático) (Phillips y cols, 2010) y para que haya migración de PSCs uno de los requisitos previos es de co-metástasis (Nielsen y cols, 2014).

a) KCa3.1: Uno de los canales de iones estudiados, más importantes, implicados en la migración celular es un canal K, sensible al ión Ca^{2+}, de conductancia intermedia, KCa3.1, que se expresa en casi todas las células migratorias (Schwab y cols, 2012).

En el caso de las células estrelladas pancreáticas expresan funcionalmente canales KCa3.1 cuya actividad es necesaria para la migración, y ésta está regulada por $[Ca^{2+}]_i$, y actúa en cooperación con el canal TRPC3.

b) TRPC3 (proteína 3 del receptor transitorio (TRP-3)), implicada en la regulación del tono vascular, el crecimiento celular, la proliferación y la hipertrofia patológica. Estos son canales catiónicos sensibles a diacilglicerol, regulan el calcio intracelular a través de la activación de la vía de la fosfolipasa C y/o detectando la acumulación de Ca^{2+} en el interior celular (Xu y cols, 2013).

Los canales KCa3.1 y TRPC3 están localizados estrechamente en la membrana plasmática. EL Ca^{2+} que entra en la célula vía TRPC3 puede activar los canales KCa3.1 vecinos. El consiguiente paso es la hiperpolarización del potencial de la membrana celular que aumenta o mantiene la fuerza motriz electroquímica para la entrada de Ca^{2+}. Por el contrario, una despolarización de la membrana celular, bloqueando los canales KCa3.1 conduce a una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$.

Una retroalimentación positiva excesiva entre la activación de KCa3.1 inducida por el flujo de Ca^{2+} mediada por TRPC3 puede ser evitado por el impacto despolarizante de la entrada de cationes a través de los canales TRPC3 (Storck y cols, 2017).

Implicaciones de las PSC en la patología pancreática:

a) Cáncer pancreático:

El adenocarcinoma ductal pancreático presenta una tasa de supervivencia máxima de 5 años (New y cols, 2017). Fels y cols. (2016) investigó la base de la activación mecánica de PSC de ratón. El estudio demostró que existía un aumento de la migración celular asociado a un aumento del calcio libre intracelular.

Las PSC desempeñan un papel crítico en la progresión del cáncer de páncreas. Una vez activadas, las PSC proliferan incluso co-metastatizan con células del carcinoma. En los últimos años, se ha establecido que la proliferación, migración, e

invasión dependen de la expresión y función de los canales iónicos (Storck y cols, 2017).

b) Pancreatitis:

La bradiquinina es un péptido que se libera de las células acinares dañadas durante la pancreatitis. Las PSC expresan el receptor de bradiquinina-2 y se ha demostrado que responden a la bradiquinina *in vitro* mediante un aumento de la liberación de calcio intracelular, provocando la activación de las células (Gryshchenko y cols, 2016). Curiosamente, aunque las células acinares no expresaban receptores de bradiquinina, el bloqueo del receptor de bradiquinina-2 reduce la extensión de la necrosis acinar inducida por etanol, ésteres etílicos de ácidos grasos y ácidos biliares. Los autores especulan que la bradiquinina activa las PSC que, a su vez causan lesiones acinares.

c) Pancreatitis biliar aguda:

La pancreatitis biliar aguda, es una enfermedad grave caracterizada por la activación prematura de las enzimas digestivas dentro de las células acinares, seguida de necrosis e inflamación.

El colato sódico y el taurocolato indujeron elevaciones citosólicas de Ca^{2+} en células estrelladas, mayores que las provocadas simultáneamente en las células acinares vecinas, provocando necrosis en ambas. Por el contrario, el ácido taurolitocólico 3-sulfato (TLC-S), conocido por inducir las oscilaciones de Ca^{2+} en las células acinares, tuvo sólo efectos menores sobre las células estrelladas en los lóbulos (Ferdek, y cols, 2011).

Estos estudios, entre otros, muestran la importancia de la homeostasis del calcio intracelular en la función de las PSC.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los objetivos de este trabajo experimental fueron los siguientes:

1. Describir las PSC y su implicación en las patologías que afectan a la glándula.

2. Preparar cultivos primarios de células estrelladas del páncreas sobre los que poder realizar investigaciones mediante el uso de técnicas de biología celular.

3. Determinar su utilidad para el estudio de la viabilidad celular tras la estimulación con distintas sustancias.

4. Determinar su utilidad para el estudio de mecanismos de señalización intracelular, centrándonos en la monitorización de calcio libre en el interior de las células.

6. METODOLOGÍA

6.1. ANIMALES Y MATERIAL

6.1.1. ANIMALES:

- Ratitas *Wistar* neonatas (5-7 días de vida). Los animales fueron obtenidos del Animalario de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, tratados de acuerdo a la legislación vigente relativa a la utilización de animales para la experimentación científica: Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia («BOE» núm. 34, de 8 de febrero de 2013) y Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia («BOE» núm. 78, de 1 de abril de 2015).

6.1.2. MATERIAL:

- 2 juegos de tijeras.

- 2 juegos de pinzas.

- Alcohol 70 %.

- Placas de cultivo de 10 cm de diámetro, de 33 mm, y/o multipocillos (6,12, 24, 96).

- Cubreobjetos circulares de 24 mm de diámetro.

- Medio HBSS: 24020-091 GIBCO (Invitrogen).

- Tubos falcon de 15 y 50 ml.

- Colagenasa CLSPA 5273 (Worthington Biochemical corp). Labclinics.

- Puntas de pipeta (de 1 ml, de 10-200 microL).

- Pipetas automáticas.

- Trypsin- EDTA 25300-062 GIBCO (Invitrogen).

- Medio 199: 31153-026 GIBCO.

-Suero bovino fetal: CH30160.03 HyCLONE.

- Suero de caballo: 26050-070 GIBCO (Invitrogen).

- HEPES: (ácido N-[Hidroxietil] piperazina.N´- [2-etanosulfónico]) H-3375 SIGMA.

- AlamarBlue: BUF012B. BioNova.

- Fura-2/AM: fura-2 acetoximetil éster (cell permeant) F-1201 Invitrogen.

- Inhibidor de tripsina: T-9253 SIGMA.

- Albúmina sérica bovina: A-4503 SIGMA.

- Penicilina/estreptomicina: 16SV30010 PAA Laboratories GMBH.

- Tapsigargina: T-9033 SIGMA.

- Melatonina: M-5250 SIGMA

- Anticuerpo primario Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (conejo): G-9269, SIGMA.

- Anticuerpo primario Anti- Desmin (conejo), PA1-27003, Invitrogen.

- Anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IGG (HL) FITC, 31583, Invitrogen.

6.1.3. EQUIPAMIENTO:

- Cabina de flujo la minar.
- Incubador de CO2.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.
- Sistema de análisis de imagen por fluorescencia.
- Baño María con agitación.
- Microscopio.

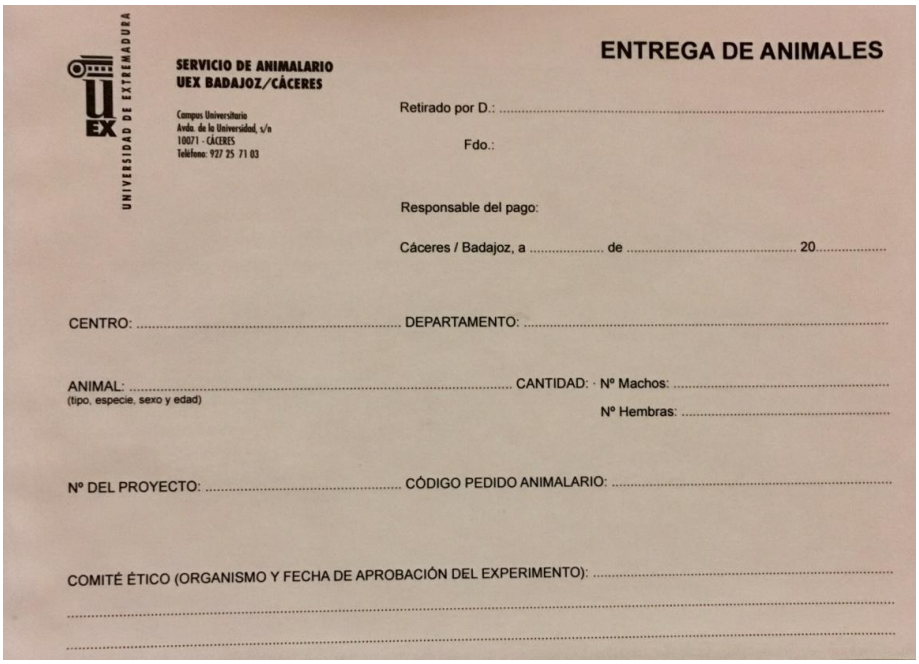
6.2. MÉTODOS:

6.2.1. PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS.

Para la obtención de este tipo celular utilizamos ratitas *Wistar* de unos 5-7 días de edad, nacidas y criadas en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura (figura 14). Los animales fueron tratados de acuerdo a lo dispuesto en la normativa legal vigente (RD 53/2013) y se han respetado los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (Orden ECC/566/2015).

Figura 14: ratitas Wistar de unos 5-7 días de edad, nacidas y criadas en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura.

Para poder disponer de estos animales es necesario tener una autorización, así como hacer la petición de los mismos con el tiempo suficiente. Cuando los animales están disponibles, cada día que se vaya a hacer una preparación, se procede a su recogida en el animalario. Esta recogida queda registrada, para lo que es necesario cumplimentar el documento de entrega de animales (figura 15).



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

SERVICIO DE ANIMALARIO
UEX BADAJOZ/CÁCERES

Campus Universitario
Avda. de la Universidad, s/n
10071 - CÁCERES
Teléfono: 927 25 71 03

ENTREGA DE ANIMALES

Retirado por D.: .....

Fdo.:

Responsable del pago:

Cáceres / Badajoz, a ..... de ..... 20.....

CENTRO: ..... DEPARTAMENTO: .....

ANIMAL: ..... CANTIDAD: Nº Machos: .....
(tipo, especie, sexo y edad)
Nº Hembras: .....

Nº DEL PROYECTO: ..... CÓDIGO PEDIDO ANIMALARIO: .....

COMITÉ ÉTICO (ORGANISMO Y FECHA DE APROBACIÓN DEL EXPERIMENTO): .....
.....
.....

Figura 15: Documento de recogida de animales en el Servicio de Animalario de la UEx.

Como podemos comprobar, queda registrado el número de animales, el sexo de cada uno de ellos, la persona que los va a utilizar y el destino de los mismos.

Previo a la extracción del páncreas, los animales se sacrificaron por decapitación, método considerado adecuado y que se puede aplicar en estos animales para causarles el menor estrés y sufrimiento posible. Para cada preparación se emplearon 4-5 animales, y se han venido realizando de una a dos preparaciones por mes.

Para la extracción del páncreas utilizamos 2 juegos de pinzas y tijeras. Un juego para la incisión y abertura externa del animal, y otro, de menor tamaño, para la disección y extracción del páncreas, y su manipulación posterior. Además debemos preparar:

- Puntas de pipeta (1 mL), cortadas de modo que los orificios presenten diámetros decrecientes, y flameadas (evita bordes cortantes).

- Medio HBSS: en el que hacemos un lavado del páncreas tras su extracción (GIBCO, Invitrogen).

- Solución de colagenasa: Enzima que rompe las uniones celulares y facilita la disgregación de éstas. Utilizamos 50 Unidades/mL de colagenasa CLSPA de Worthington. Se prepara en solución Sodio-Hepes (Na+-HEPES; 2 mL), que tiene la siguiente composición (Tabla 1):

	Mw	**[mM]**
NaCl	58.44	130
KCl	74.56	4.7
CaCl2	147.02	1.3
MgCl2*6H2O	203.3	1
KH2PO4	136.09	1.2
Hepes	238.3	10
Glucosa	180.16	10
Albúmina	-	0.2% (w/v)
Inhibidor de tripsina	-	0.01% (w/v)

Tabla 1: Composición de la solución Na-H para aislamiento de células

El pH de esta solución se ajusta a 7,4 con NaOH 1 N.

Tras el sacrificio rociamos los cuerpos con alcohol al 70% y los llevamos a la campana de flujo laminar, introducidos en una placa de petri de 10 cm de diámetro que también rociamos con alcohol al 70% para prevenir posibles contaminaciones, y una vez allí procedemos a la extracción del páncreas. En primer lugar colocamos el cuerpo de la ratita en decúbito lateral derecho, puesto que al páncreas se accede mejor por el lado izquierdo; lo localizaremos entre el estómago y el bazo. Con las pinzas más grandes cogemos una porción de piel justo por detrás de la última costilla y con las

tijeras en posición vertical se realiza un corte en la pared abdominal. Podemos observar el hígado, bazo, estómago, asas intestinales y el páncreas (muy pequeño).

Con las pinzas pequeñas extraemos el páncreas, lo separamos del resto de órganos con las tijeras pequeñas y lo introducimos en el medio HBSS, donde le retiramos cualquier resto que presente.

Una vez limpios los páncreas les ponemos en la solución de colagenasa, los troceamos con la tijera, lo ponemos en un tubo falcon de 15 mL y los incubamos en agitación en el *baño maría*, durante 1 hora a 37ºC. Previamente aireamos la suspensión con O_2.

Concluida la incubación centrifugamos 5 minutos, a 600 rpm (unas 30 x *g*), a 6 ºC. Retiramos el sobrenadante y añadimos un medio denominado Medio de Inactivación de Tripsina (TIM, 2 ml) (para inactivar la colagenasa) (tabla 2). Incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Producto	**Cantidad**
Albúmina	125 mg
Inhibidor de tripsina	125 mg
Medio 199	50 ml

Tabla 2: Composición de la solución TIM.

Volvemos a centrifugar (mismas condicionas que antes), retiramos el sobrenadante y añadimos 2 mL del medio de cultivo para estas células (ver composición en la tabla 3). Pipeteamos la suspensión con las puntas de pipeta de diámetros decrecientes (durante unos 5 min) y filtramos la suspensión utilizando un filtro “cell strimer” con diámetro de 100 micras. De este modo obtenemos una suspensión uniforme de células pancreáticas que sembraremos en el sustrato correspondiente (placa de petri o cubre objetos), sobre el que se adhieren las células y en el que proliferarán.

6.2.1.1 Medio específico de las células estrelladas pancreáticas:

Emplea como base medio 199 (GIBCO). (Figura 16), el cual reconstituimos con suero bovino fetal (Hyclone), suero de caballo (SIGMA), antibiótico (penicilina y estreptomicina; PAA Laboratories GMBH.) y bicarbonato sódico (1 mM). La composición del medio de cultivo utilizado está detallada en la tabla 3.

Figura 16: Medio de cultivo 199 (GIBCO).

M 199 (ml)	SUERO BOVINO FETAL (ml)	SUERO EQUINO (ml)	ATB (ml)	NaHCO3 1 mM (µl)
500	58.1	23.3	2.9	581

Tabla 3: Composición del medio de cultivo 199 reconstituido.

Normalmente utilizamos unos 10 ml de este medio para las placas grandes (10 cm de diámetro), y 2 ml para las pequeñas (35 mm diámetro) (figura 17) y las de 6 pocillos, mientras que añadimos 1 ml para las placas de 12 pocillos, en las que estudiamos la viabilidad celular. En las placas de 10 cm sembramos normalmente 150 microL de la suspensión celular obtenida, 50 microL sobre cubres circulares en las placas de 35 mm y en las de 6 pocillos, y 30 microL en las de 12 pocillos. Las células se dejan crecer hasta alcanzar confluencia, cambiando los medios cada 48-72 horas (esto va en función de la velocidad de crecimiento).

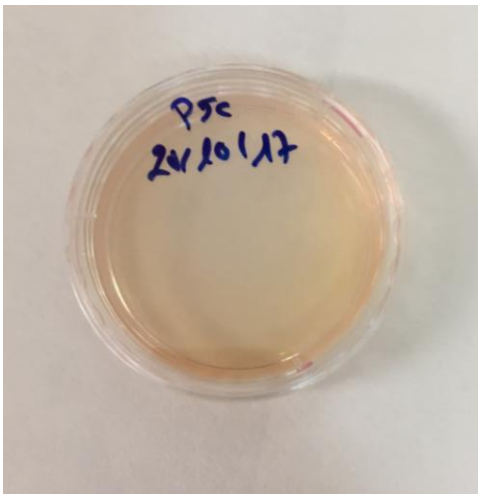


Figura 17: Cultivo primario de PSC en placa de 35 mm sobre cubre estéril.

6.2.1.2. Preparación de células para resiembra o experimentación:

Para la mayoría de las determinaciones, las células se utilizan adheridas al sustrato en el que se sembraron. Sin embargo, en algunas ocasiones se pueden hacer resiembras para disponer de más células tras una única preparación. Para este propósito necesitamos despegarlas de la superficie de la placa y extraerlas de la misma.

En primer lugar retiramos unos 3 ml del medio del cultivo y lo ponemos en un tubo falcon (15 ml) (utilizamos el número de falcon necesario en función de las placas que vayamos a utilizar) y desechamos el resto. Guardamos esta cantidad de medio puesto que necesitaremos que el suero bovino inactive la tripsina posteriormente.

Realizamos un lavado de la placa con PBS (tabla 4) éste va a eliminar los restos que queden de suero en las células, permitiendo el efecto de la tripsina), y añadimos unos 2 ml de medio con tripsina (Trypsin-EDTA, GIBCO, Invitrogen; permite que se despeguen las células de la superficie de la placa). Incubamos unos 3-4 minutos a 37ºC. Terminamos de despegar las células mediante pipeteo por arrastre y las incorporamos a los falcon preparados inicialmente con los 3 ml de medio.

Producto	**Molaridad (mM)**	**PM**	**g/L**
NaCl	137	58.44	8.0063
KCl	2.7	74.56	0.2013
Na_2HPO_4	10	177.99	1.7299
KH_2PO_4	2	136.09	0.2722

Tabla 4: Composición de la solución PBS.

Centrifugamos a 600 rpm (30 x *g*), 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente retiramos el sobrenadante, y añadimos el medio de cultivo hasta unos 10 ml, y ya están listas nuestras células para ser resembradas o utilizarlas para experimentos.

6.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS PSC: INMUNOCITOQUÍMICA.

6.2.2.1. Fundamento:

La inmunocitoquímica es una técnica que nos permite reconocer determinadas moléculas, en nuestro caso proteínas, en los cultivos celulares gracias al uso de anticuerpos específicos. Esta técnica se ha convertido en un método sencillo y rápido gracias a la oferta comercial de anticuerpos y la estandarización de su protocolo. Comúnmente se emplean dos anticuerpos: uno primario, que se une a la proteína celular en cuestión, y uno secundario, que se une al anticuerpo primario. Estos anticuerpos secundarios van a ser conjugados con sustancias fluorescentes o enzimas para la detección y visualización de las moléculas.

Para que un anticuerpo se una a su antígeno, localizado en la célula en cuestión, se realiza un proceso de fijación, con el fin de que no cambie la estructura de la célula tras el tratamiento al que se haya sometido.

Los anticuerpos, aunque se unan al antígeno, no son visibles con el microscopio. Utilizando moléculas fluorescentes a las que están unidos se pueden observar con el microscopio de fluorescencia, mientras que la unión con enzimas (peroxidasa y fosfatasa alcalina, fundamentalmente) convierten moléculas solubles e incoloras en productos insolubles y coloreados.

La conjugación puede ser directa (anticuerpo primario + enzima/ fluorescente) o indirecta, mediante el uso de un anticuerpo secundario, entre el primario y la molécula marcadora. La indirecta ofrece una mayor intensidad de señal frente a una misma cantidad de antígeno.

En la detección con enzimas inicialmente se usó el método indirecto denominado peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), pero actualmente es más frecuente usar el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa. (Figura 18).

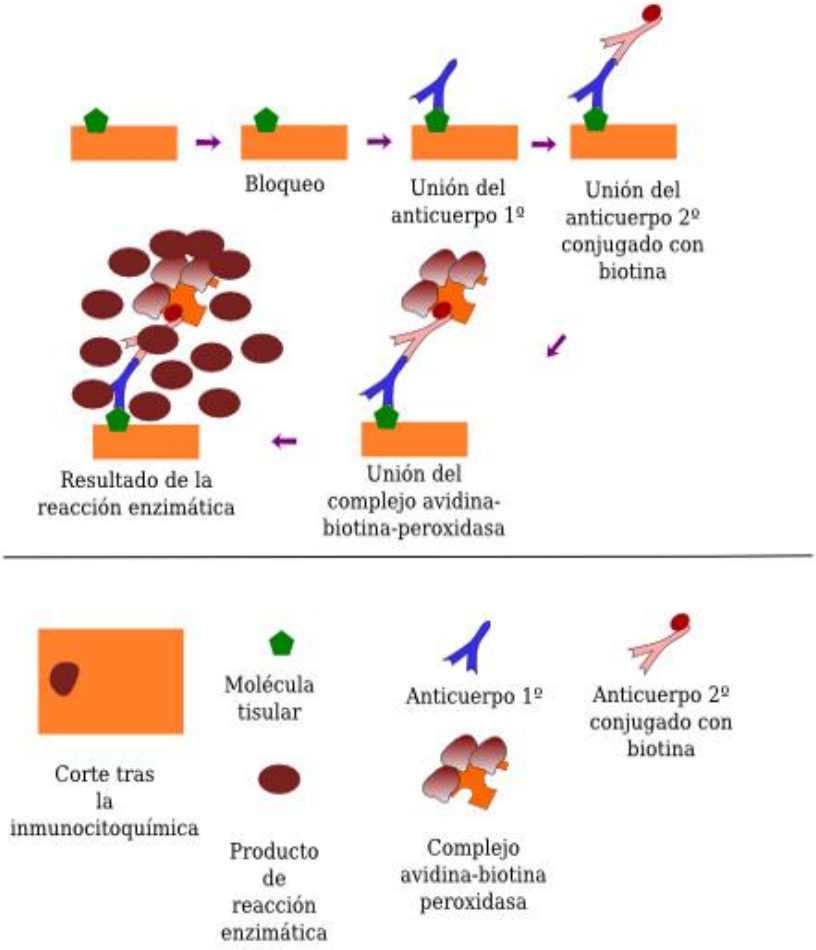


Figura 18: Inmunocitoquímica indirecta y enzimática. Incubación con una solución de bloqueo que satura los sitios de unión inespecífica. Unión de los anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa, lavado con tampón fosfato y reacción enzimática. (Megías y cols, 2007).

Por otra parte, los fluorocromos son moléculas que emiten luz visible cuando se les ilumina con una determinada longitud de onda. Existe multitud de ellos, que son capaces de responder a diferentes longitudes de onda, es decir, podemos detectar dos o más moléculas en una misma célula (figura 19).

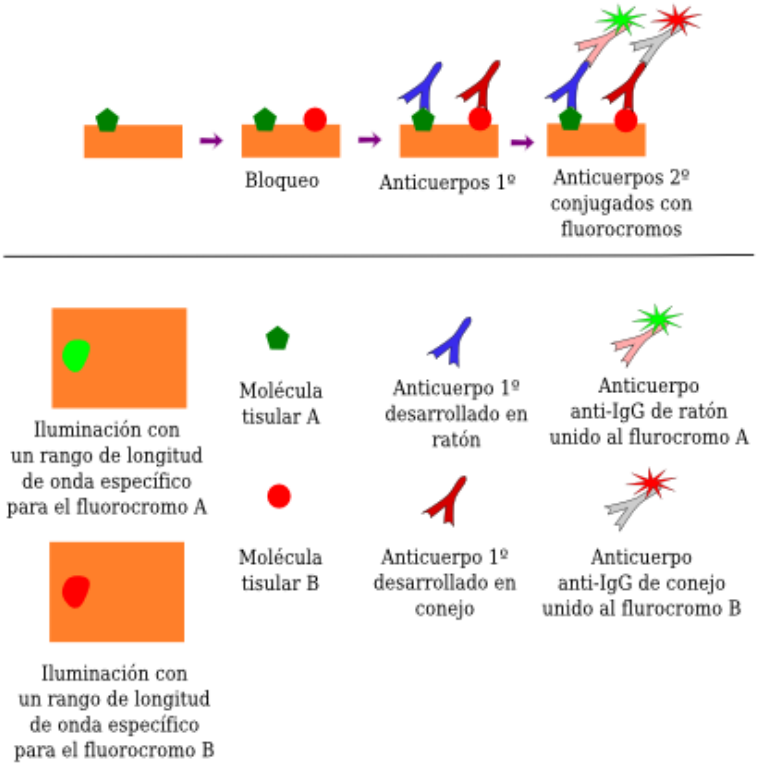


Figura 19: Inmunocitoquímica fluorescente e indirecta. Detección simultánea de dos moléculas situadas en una misma sección mediante inmunofluorescencia. La razón de que los dos anticuerpos primarios procedan de dos animales diferentes es que los anticuerpo secundarios, obtenidos de otro animal, normalmente cabra u oveja, inmunizados con las inmunoglobulinas de ratón y conejo, respectivamente, es lo que permite a cada anticuerpo secundario reconocer y unirse a un anticuerpo primario determinado y no al otro. (Megías y cols, 2007).

6.2.2.2. Preparación de soluciones para inmunocitoquímica:

- Preparación de tampón fosfato (PB) 0.2M:

Solución A (ácida) (tabla 5):

Fosfato sódico monobásico (NaH2PO4. 1H2O)	27.6 g	15.8 g
Agua destilada	1000 ml	500 ml

Tabla 5: Preparación de la Solución A para PB.

Solución B (alcalina) (tabla 6):

Fosfato sódico dibásico ($Na_2HPO4.\ 12H_2O$)	71.7 g	38.85 g
Agua destilada	1000 ml	500 ml

Tabla 6: Preparación de la solución B para PB.

Se mezclan las soluciones A y B en proporción 19/81 respectivamente. Primero se coloca la solución alcalina en un recipiente y la solución ácida se va añadiendo lentamente, en agitación continua. De esta forma se obtiene un PB 0.2M con un pH de 7.4. En el caso de no obtener el pH deseado, podemos ajustarlo añadiendo pequeñas cantidades de la solución A o B, según se necesite bajar o subir el pH. A partir de esta solución preparamos un tampón fosfato salino.

- Preparación de tampón fosfato salino (PBS) 0.01M (Tabla 7):

	1L PBS 0.01M	**100 ml PBS 0.01 M**
PB 0.2M pH 7.4	50 ml	5 ml
Cloruro sódico	8.76 g	0.876 g
Cloruro potásico	200 mg	20 mg
Agua destilada	950 ml	95 ml

Tabla 7: Preparación de PBS.

A partir de ésta, preparamos las soluciones necesarias para realizar la inmunocitoquímica:

1. *Paraformaldehído-PBS:* PBS 0.01M con 4% paraformaldehído: 4g paraformaldehído/100ml PBS. Conservar a 4ºC.

2. Tritón-PBS: PBS 0.01M con 0.1% Tritón X-100: 100µl Tritón/100ml PBS. Conservar a 4ºC.

3. BSA-PBS-GS: PBS 0.01 M con 10% suero de cabra (goat serum, GS) (10ml GS/100 ml PBS) y 1% albúmina de suero bovino (BSA) (1G BSA/100ml PBS). Esterifiltramos. Conservar a 4ºC.

4. BSA-PBS: PBS 0.01M con 1% BSA: 1g BSA/100ml PBS. Esteriltrarmos. Conservar a 4ºC.

6.2.2.3. Protocolo:

Utilizamos células sembradas en placas individuales sobre cubres redondos estériles de 24 mm de diámetro, una vez han alcanzado confluencia. El protocolo a seguir es el siguiente (tabla 8).

1. Fijación con formaldehído: se retira el medio de cultivo de cada pocillo y a continuación se añade 1,5 ml de formaldehído y se deja 10 minutos.

2. Permeabilización de la membrana: se añaden 1,5 ml de tritón X-100 al 0.1% en PBS y se realizan 3 lavados de 5 minutos.

3. Incubación con el anticuerpo primario: en primer lugar incubamos 45 minutos con 1ml de BSA-PBS-GS y posteriormente 60 minutos con el anticuerpo primario (5µl) en esta misma solución. Pasado este tiempo realizamos 1 lavado de 5 minutos con PBS (1ml).

Utilizamos anticuerpos primarios; en este trabajo hemos detectado la expresión de GFAP y desmina. Se trata de proteínas de filamento intermedio del citoesqueleto presentes en PSC.

4. Incubación con el anticuerpo secundario: 60 minutos con el anticuerpo secundario en PBS-BSA.

Los anticuerpos secundarios están marcados con sondas fluorescentes (FITC), gracias a los cuales podremos ver la reacción de estas células en el microscopio de fluorescencia.

5. Lavados: Para finalizar realizamos varios lavados con PBS durante 10 minutos aproximadamente.

	TIEMPO (minutos)
Paraformaldehído	10
Tritón X-100 0.1%	5 (x 3)
BSA-PBS-GS	45
BSA-PBS-GS + Anticuerpo 1º	60
Lavado PBS	5
PBS-BSA + Anticuerpo 2º	60
Lavados PBS	10

Tabla 8: Resumen protocolo inmunocitoquímica.

A continuación, montamos la cámara de perfusión con cada cubre y procedemos a observar los resultados en el microscopio de fluorescencia (figura 20).

Figura 20: Microscopio de fluorescencia de la Unidad de Fisiología animal. Facultad de veterinaria. Uex.

6.2.3.VIABILIDAD CELULAR

Uno de los objetivos de este trabajo era el estudio de la viabilidad de estas células. La línea de investigación que están desarrollando en el grupo del Departamento de Fisiología con el que he desarrollado este TFG está dirigida al estudio de las acciones de la melatonina sobre la fisiología de las PSC. En este apartado, las células se sembraron en placas de 12 pocillos, y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de melatonina durante 24, 48, 72 y 96 horas. Tras la incubación de las células, añadimos en cada pocillo un colorante vital, ALAMAR BLUE al 5% (BioNova).

El reactivo de viabilidad de células alamarBlue es una solución lista para usar basada en resazurinas que funciona como un indicador de salud celular mediante el uso del poder reductor de las células vivas para medir la viabilidad cuantitativamente. Resazurin, el ingrediente activo del reactivo alamarBlue, es un compuesto no tóxico, permeable a las células, de color azul y prácticamente no fluorescente. Al entrar en las células vivas, la resazurina se reduce a resorufina, un compuesto que es de color rojo y fluorescente. Los cambios en la viabilidad se pueden detectar fácilmente usando un lector de placas basado en absorbancia o fluorescencia. El reactivo de viabilidad de células alamarBlue tiene una amplia aplicabilidad y se puede usar con diversas líneas de células humanas y animales, bacterias, plantas y hongos.

De esta manera, las células activas metabolizan este colorante y la solución toma un color más claro, mientras que las no activas no lo metabolizan, y la solución, toman un color más oscuro. La viabilidad celular, relacionada con el cambio de color (y también de absorbancia a 570 nm) y/o de fluorescencia (590 nm), se mide empleando un lector de placas (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria).

6.2.3.1. Estimulación de células:

En primer lugar debemos preparar los estímulos a una concentración determinada (1 mM, 100 microM, 10 microM y 1 microM). Para ello se parte de una solución madre de 5 mM de melatonina:

Melatonina 5 mM: 0.018 g en 10 ml de Na-H.

1 mM --> 34ml (27.2 ml de medio + 6.8 ml Mel. 5 mM.

100 µM --> 34 ml (33.32 ml de medio + 680 µl Mel. 5 mM.

10 µM --> 34 ml (34 ml de medio + 68 µl Mel. 5 mM.

1µM --> 34 ml (34 ml de medio + 340 µl Mel. 100 µM)

Cada concentración la dividimos en dos de 17 ml.

Tapsigargina (TPS) 1 µM: 34 ml de medio + 34 µl de TPS 1 mM. Este compuesto induce muerte celular, y se utiliza como control para los estudios de viabilidad celular.

6.2.3.2. Preparación de placa multipocillos:

Para medir viabilidad utilizamos las células sembradas en placas multipocillos de 24 (6 columnas por 4 filas). Para poder obtener unos resultados comparativos, necesitamos un control negativo (serán las células no estimuladas) y un control positivo (serán las células estimuladas con tapsigargina (TPS)).

Esta tabla (tabla 9) simula 12 pocillos de una placa de 24 pocillos. De cada pocillo retiramos el medio de cultivo, y añadimos: 1 ml de medio, sin estímulo, para el control negativo (A), y 1 ml de TPS en la última columna (columna B) para el control positivo y 1 ml de las distintas concentraciones de melatonina en las casillas 1 y 2.

No estimuladas	Mel. 1mM	Mel. 100 µM	Mel. 10 µM	Mel. 1 µM	TPS 1 µM
A	1	1	1	1	B
A	2	2	2	2	B

Tabla 9: Estimulación de células según las distintas concentraciones de melatonina para el estudio de viabilidad.

Las células se incuban el tiempo necesario (24 h – 96 h) en presencia de cada estímulo.

Al término de la incubación, para medir la viabilidad, se añade ALAMAR BLUE (5% concentración final en el pocillo). Como se ha comentado anteriormente, las células activas metabolizan un reactivo que forma parte del compuesto. Añadimos 50 µl de la solución de ALAMAR BLUE a cada pocillo y lo incubamos durante 1 hora a 37ºC.

Posteriormente cogemos 150 µl de cada pocillo y lo llevamos a pocillos más pequeños montados sobre un marco (figura 21 y 22) en el que medirá el lector de placas (espectrofotómetro) (figura 23), en el que se determinará la fluorescencia emitida a 590 nm tras excitación a 530 nm.

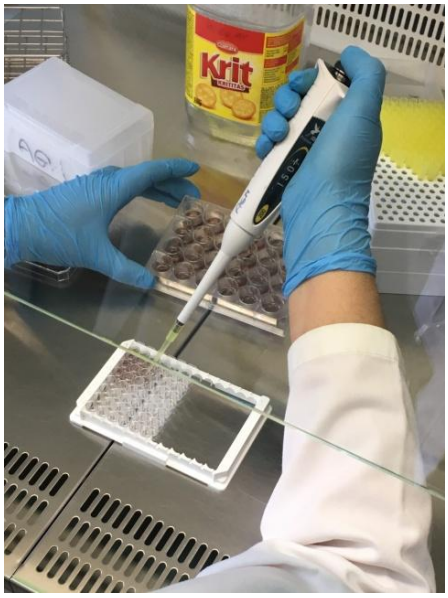


Figura 21: Intercambio de una placa a otra de la solución celular

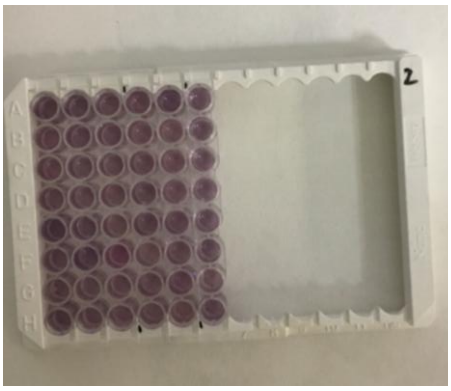


Figura 22: Pocillos sobre marco listos para medir en el lector

Figura 23: Lector de placas Tecan Infinite M200.

6.2.4. FLUORESCENCIA. ESTUDIOS DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO

El ión Ca^{2+} es el mensajero intracelular más distribuido del mundo. Los cambios en su concentración intracelular regulan gran cantidad de procesos celulares, como la contracción muscular, excitabilidad neuronal, secreción de enzimas digestivas, neurotransmisión, cambios en el estado redox o apoptosis (Missiaen y cols, 2000).

Como se expuso anteriormente, el mecanismo de regulación de la fisiología pancreática se basa en un aumento de la concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (Hosfield y cols, 1999).

Para que actúe como señal es necesario un aumento del mismo en el interior celular, pero si este es excesivo puede dar lugar a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Roy y Hajnóczky, 2008).

6.2.4.1. Fundamento:

Para la determinación de los cambios en la concentración de calcio libre intracelular, se utilizó un sistema de análisis de imagen dotado de un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Diaphot T200, Melville, NY, USA). En un microscopio de fluorescencia, a diferencia de uno convencional, se utiliza una fuente de iluminación de intensidad elevada, generalmente basada en una lámpara de arco de mercurio o de xenón que ilumina la muestra a través de un filtro interferencial (excitación) y un espejo dicroico. Ambos seleccionan una banda del espectro óptima para la excitación del fluorocromo, que emite luz (fluorescencia) a una longitud de onda mayor. Para iluminar las muestras se utilizó la fluorescencia emitida alternativamente a 340/380 nm por un monocromador (Polychrome IV, Photonics, Hamamatsu, Japon). Esta luz es recogida por el objetivo, pasa el espejo dicroico y un segundo filtro interferencial (emisión) y es enfocada en un plano para formar la imagen amplificada del objeto fluorescente, accesible al observador a través de los oculares o a un dispositivo de captura de imagen (cámara de video, cámara digital CCD, etc) a través de

un puerto especial. La cámara utilizada es una ORCA Flash 4.0 V2 digital CMOS camera (Hamamatsu Photonics-France, Barcelona). Así, el microscopio de fluorescencia forma una imagen amplificada de la muestra, pero utiliza únicamente la luz fluorescente emitida por los fluorocromos presentes en ella. La fluorescencia emitida por las células se analizó empleando el software HCImage (Hamamatsu Corp., Sewickley, PA, USA). (Figura 24).

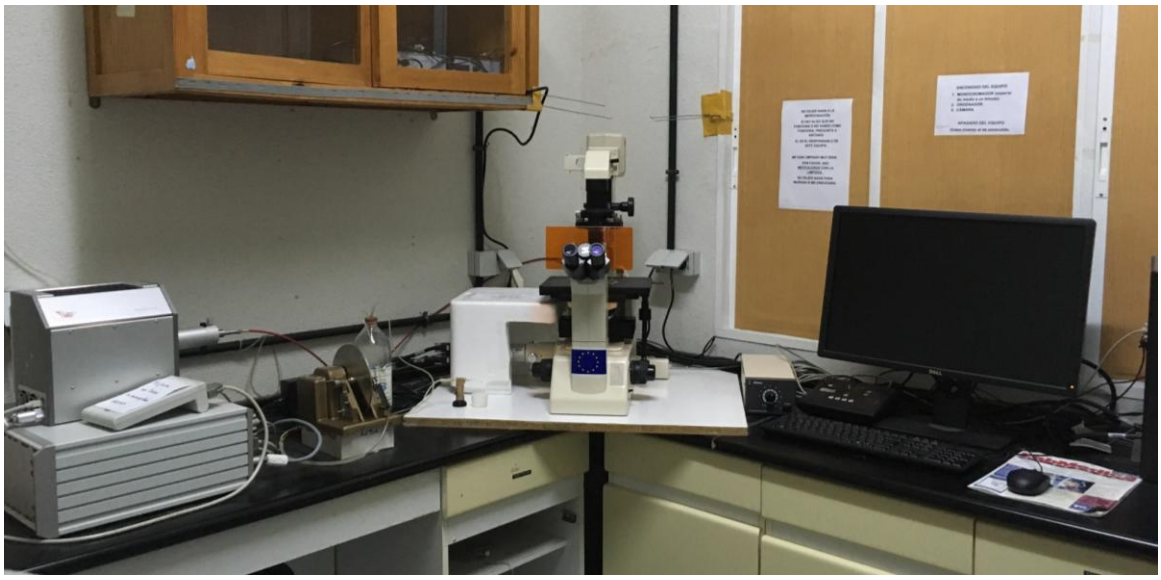


Figura 24: Equipamiento de la sala para medición de fluorescencia. De izquierda a derecha: monocromador, microscopio de fluorescencia y ordenador con software para análisis de imágenes.

Determinación de la concentración de calcio libre intracelular

Las células son incubadas con un fluoróforo (fura-2/AM) que va a emitir una fluorescencia proporcional a la concentración de calcio libre intracelular, y que es posible detectar mediante el uso de un microscopio de fluorescencia.

La molécula de fura-2/AM presenta un acetoximetilo, gracias al cual puede penetrar en la célula puesto a que le confiere un carácter apolar. En el interior unas esterasas hidrolizan el enlace entre el fura-2/AM y el grupo metilo, cambia la molécula, se vuelve polar, y el fura-2 se queda en el interior celular.

Las propiedades de fluorescencia del fura-2 dependen de la $[Ca^{2+}]_i$ esta sonda se excita a dos longitudes de onda, 340 y 380 nm, y emite fluorescencia a 505 nm. Cuando aumenta la concentración, la fluorescencia emitida tras su excitación a 340 nm aumenta, y la emitida tras su excitación a 380 disminuye, siendo así un gran sensor de las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$, puesto que los cambios en su florescencia están directamente relacionado con los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ (Grynkiewicz y cols, 1985). Los resultados se expresan como el ratio:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Fluorescencia emitida a 505 nm cuando se exita a 340 nm}}{\text{Fluorescencia emitida a 505 nm cuando se exita a 380 nm}}$$

6.2.4.2. Carga con el indicador.

Para ello utilizamos las células sembradas en cubreobjetos circulares colocados dentro de placas individuales de 35 mm de diámetro. Se sustituye el medio de cultivo por Na-H aislamiento (tabla 1), añadimos fura-2/AM a una concentración final de 4µM. Seguidamente incubamos las células durante 40 minutos a temperatura ambiente (20-25ºC) y en condiciones de oscuridad.

	Mw	**[mM]**
NaCl	58.44	130
KCl	74.56	4.7
CaCl2	147.02	1.3
MgCl2*6H2O	203.3	1
KH2PO4	136.09	1.2
Hepes	238.3	10
Glucosa	180.16	10
Albúmina	-	0.2% (w/v)
Inhibidor de tripsina	-	0.01% (w/v)

Tabla 2: Composición de la solución Na-H para aislamiento de células

6.2.4.3. Cuantificación de la fluorescencia del fura-2

La técnica "imaging" nos permite ver los cambios que van ocurriendo en las células de manera individual, y es útil para poder monitorizar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, :

Finalizada la incubación con el fura-2/AM, transferimos el cubre objetos con las células ya cargadas con la sonda a una cubeta de perfusión, que colocamos sobre la platina del microscopio de fluorescencia para la determinación de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$.

Preparación de estímulos:

1º Debemos preparar una solución de Na-H para experimentos (tabla 10), que utilizaremos para preparar los distintos estímulos.

	Mw	**[mM]**
NaCl	58.44	140
KCl	74.56	4.7
CaCl2	147.02	1.3
MgCl2*6H2O	203.3	1
Hepes	238.3	10
Glucosa	180.16	10

Tabla 10: Composición de la solución Na-H para experimentos.

2º Melatonina 1mM: A partir de melatonina 5 mM: 0.018 g en 10 ml de Na-H:

1 mM --> 34ml (27.2 ml de medio + 6.8 ml Mel. 5 mM.

.3ª Tapsigargina (Thapsigargin) (SIGMA): hemos usado 1 µM: 34 ml de medio + 34 µl de TPS 1 mM.

7. RESULTADOS Y DESARROLLO

7.1 Preparación de los cultivos de células estrelladas pancreáticas.

Transcurridos siete a diez días tras la preparación, las PSC han crecido en el sustrato en el que fueron sembradas y han alcanzado la confluencia. El aspecto que tienen al observarlas al microscopio es el que se puede ver en la figura 25.

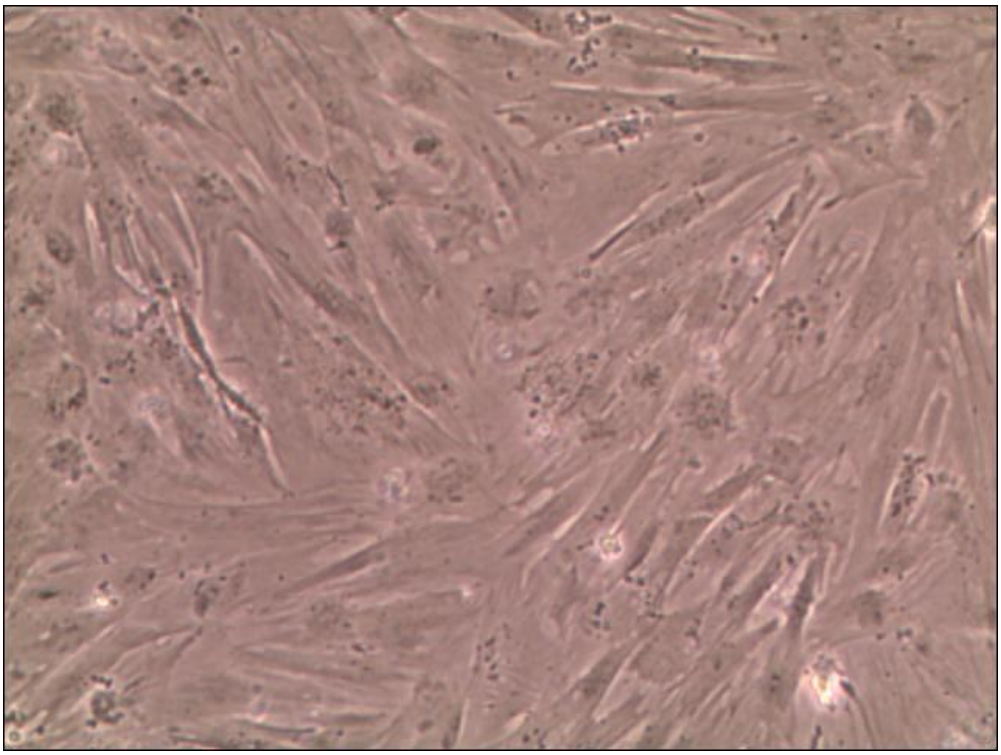


Figura 25: Imagen al microscopio óptico de PSC en cultivo primario.

7.2. Identificación de las PSC. Inmunocitoquímica

Para la identificación de marcadores de interés en las PSC, sembramos las células en cubres circulares de 24 mm de diámetro. Una vez alcanzada la confluencia, realizamos la inmunocitoquímica con el fin de comprobar la expresión de las proteínas desmina y ácida fibrilar glial (GFAP). Como se puede apreciar en la figura 26, detectamos reacción positiva para desmina (figura 26 A) y GFAP (figura 26 B), lo que nos indica que tenemos PSC en nuestro cultivo.

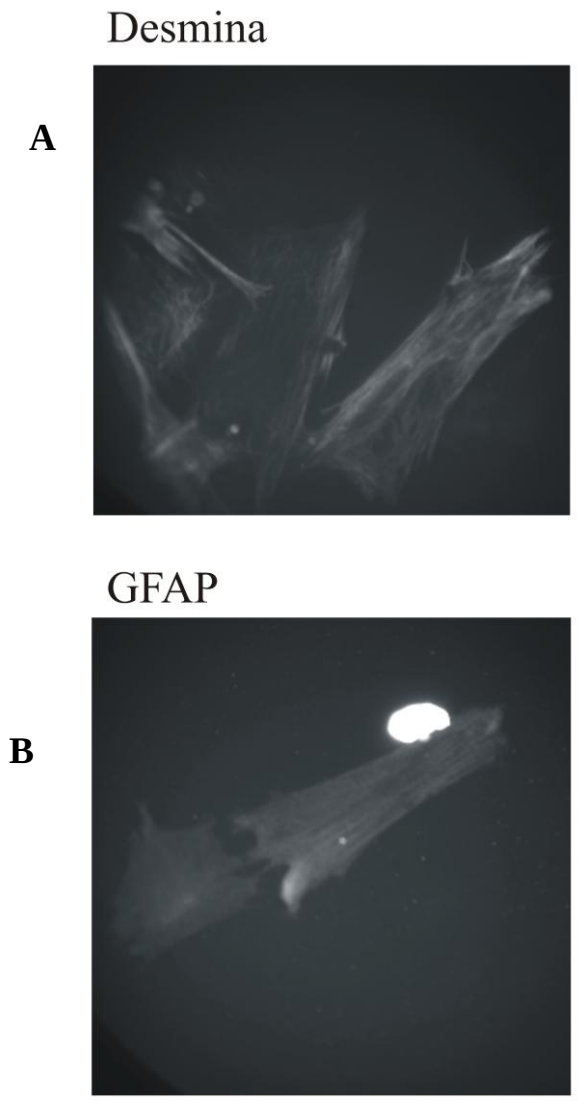


Figura 26: Inmunocitoquímica de PSC. Presencia de filamentos de desmina (A) y GFAP (B).

7.3. Viabilidad celular

Para los estudios de viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (aprox. 40.000 células/pocillo) y se incubaron en presencia de melatonina 1 mM durante 24, 48, 72 y 96 horas. La viabilidad de las células tratadas con melatonina se analizó con el colorante vital AlamarBlue, y se comparó con la de las células no tratadas, células control. Los resultados muestran que la viabilidad de las PSC tratadas con melatonina se redujo significativamente con respecto a las células no tratadas, observándose un efecto dependiente del tiempo de incubación. (Figura 27).

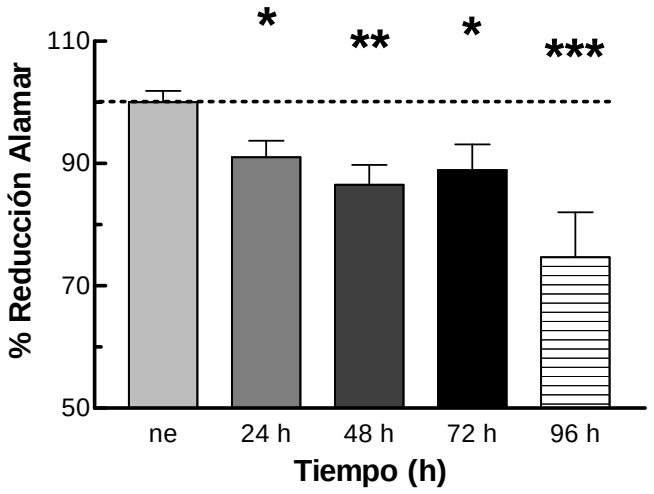


Figura 27: Histograma que muestra la viabilidad de las PSC incubadas en presencia de melatonina 1 mM durante 24-96 horas.

En otro set de experimentos, las PSC se incubaron en presencia de 1 µM de tapsigargina, un inductor de muerte celular (Nielsen y cols, 1995; (Santofimia-Castaño y cols, 2014). Como se puede observar en la figura 28, la viabilidad de las PSC incubadas en presencia de tapsigargina se redujo significativamente, en comparación con la viabilidad de las células no tratadas. Como en el caso anterior, observamos un efecto dependiente del tiempo de incubación en presencia de la droga.

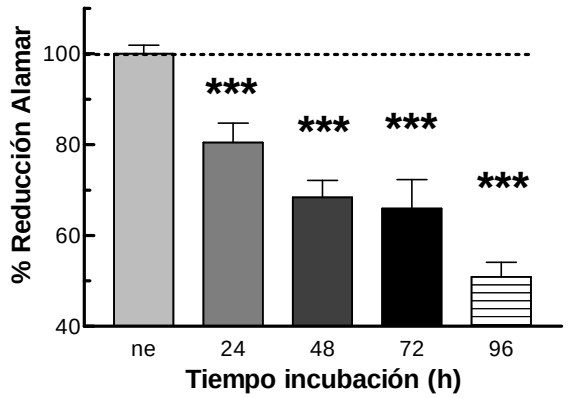


Figura 28: Histograma que muestra la viabilidad de las PSC incubadas en presencia de tapsigargina 1mM durante 24-96 horas.

7.4. Estudios de movilización de calcio

Para estos estudios, las PSC se sembraron en cubres circulares de 24 mm de diámetro. En este trabajo hemos hecho unas pruebas preliminares para averiguar si es posible monitorizar cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Una vez alcanzada la confluencia, las células se cargaron con fura-2 y se estimularon con diferentes drogas.

Los cubres se trasladaron a una cámara de perfusión que se colocó sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia. Seguidamente se perfundieron con solución Na-H. La estimulación de las PSC con tapsigargina 1 µM indujo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, alcanzando un valor estable elevado sobre el nivel de prestimulación/basal (figura 29). La tapsigargina es una droga que se utiliza para el estudio de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares (Thastrup y cols, 1994).

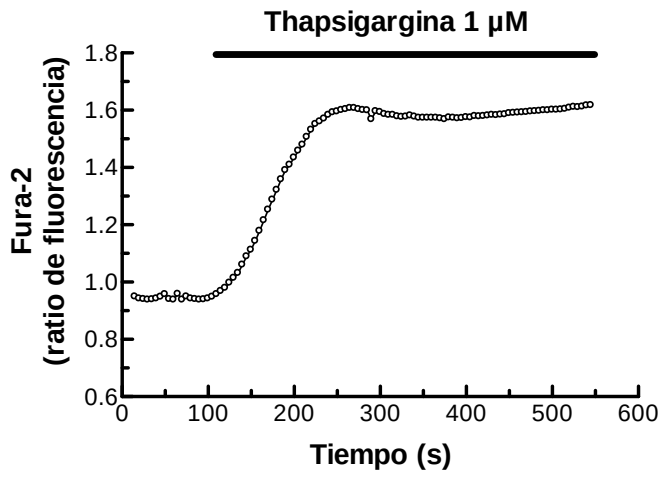


Figura 29: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la estimulación de PSC con tapsigargina.

En otro grupo de experimentos, las células se estimularon con melatonina (1mM). La figura 30 muestra una respuesta representativa de la movilización de Ca^{2+} observada. Como se puede observar, la estimulación de las PSC con melatonina indujo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, alcanzando un valor estable elevado sobre el nivel de prestimulación/basal. La estimulación posterior de las PSC con tapsigargina (1 µM) apenas indujo incremento adicional en la $[Ca^{2+}]_i$. esto parece indicar que la melatonina y la tapsigargina liberan Ca^{2+} desde el mismo depósito intracelular. La tapsigargina es un inhibidor de la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (Thastrup y cols., 1994), por lo que probablemente la melatonina libere Ca^{2+} desde este mismo depósito.

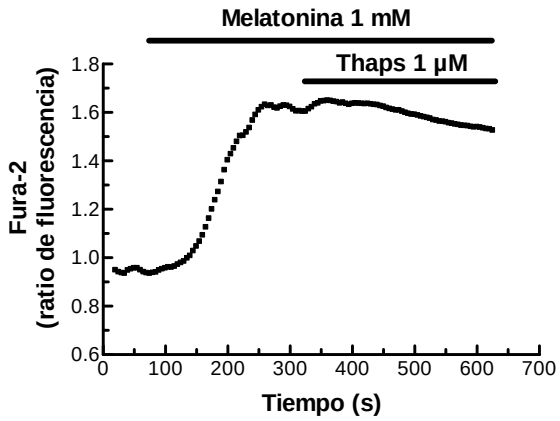


Figura 30: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la estimulación de PSC con melatonina 1 mM.

8. DISCUSIÓN Y POSIBLES LÍNEAS FUTURAS

Las PSC representan, en condiciones fisiológicas normales, un 4% de la población celular total de la glándula. En el páncreas sano, las células estrelladas se encuentran en estado quiescente (inactivas). Sin embargo, en condiciones de estrés, como por ejemplo el estrés oxidativo, o ante la llegada de mensajeros procedentes de otros tipos celulares (citocinas, factores de crecimiento,…) estas células adquieren un estado denominado "activado". La consecuencia es una transformación de estas células en un tipo celular que ahora sufrirá cambios funcionales, que comprenden un aumento de su proliferación, la fabricación de proteínas de matriz extracelular y metaloproteasas, y la secreción de factores de crecimiento y citocinas, que retroalimentan la activación de más células estrelladas. Además, podrían influir en otros tipos celulares vecinos (McCarroll y cols, 2003).

Se ha propuesto que las PSC están involucradas en una comunicación significativa entre las células cancerosas y el estroma en el páncreas. Estas interacciones resultan en progresión tumoral, metástasis, hipoxia tumoral, evasión de la respuesta inmune y resistencia a los medicamentos. Este es el fundamento de los ensayos preclínicos y clínicos terapéuticos que se están dirigiendo en PSC y al estroma del cáncer. Por ejemplo, Takikawa y cols (2017), estudian los efectos de los exosomas, pequeñas vesículas procedentes de PSC, que incluyen ARNm, sobre la proliferación, migración y perfiles de expresión de ARNm en las células del cáncer de páncreas. Observaron que los exosomas derivados de células estrelladas pancreáticas estimularon la proliferación, migración y expresión de ARNm para los ligandos de quimiocina en células de cáncer de páncreas. La estimulación de la proliferación, migración y expresión del gen de quimioquina por el medio condicionado de PSCs fue suprimida por GW4869, un inhibidor de exosomas; los resultados de este trabajo indican la existencia de interacciones entre las PSC y las células cancerosas.

En la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer de páncreas Inoue y cols (2017) sugieren que el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGFRβ) y el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (MET) expresado en PSC modulan las interacciones entre las células de cáncer de páncreas y las PSC. Para ello realizan un estudio sobre el efecto de MK2461, un inhibidor de multiquinasa dirigido a MET y PDGFRβ, en la interacción entre las células cancerosas y las PSC, y concluyen que MK2461 altera la interacción entre las células tumorales y las PSC, y por lo tanto podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer de páncreas.

Como ya hemos comentado, la activación de las PSC da lugar a un engrosamiento de la matriz extracelular. La rigidez de esta matriz ha sido tradicionalmente considerada como una manifestación de la enfermedad. Sin embargo, Lachowski y cols (2017) estudiaron la posibilidad de que sea el microambiente mecánico el estímulo para la activación y migración de las PSC. En su estudio demuestran que la rigidez de la matriz regula la activación y la migración de las PSC. Los autores de este trabajo muestran la capacidad de las PSC para experimentar una transición fenotípica como resultado de cambios en la rigidez de la matriz extracelular en la que se encuentran, sugiriendo que la reprogramación mecánica directa de PSC puede ser una alternativa viable en el tratamiento de esta enfermedad letal.

La pancreatitis crónica es un factor de riesgo importante para el desarrollo de adenocarcinoma ductal pancreático. Birtolo y cols (2017) estudiaron el efecto de Cadherin-11, una molécula de adhesión de célula a célula implicada en muchas funciones biológicas, incluyendo morfogénesis y arquitectura de tejidos, remodelación de tejidos mediada por matriz extracelular, organización del citoesqueleto y migración celular. En este estudio, se muestra que, en la pancreatitis crónica humana y en tejidos de cáncer de páncreas, la expresión de Cad-11 aumentó significativamente en las PSC y en las células cancerosas. Por otra parte, la caída en la expresión de Cad-11 en células cancerosas redujo su migración. Tomados en conjunto, estos datos subrayan el papel potencial de Cad-11 en la activación del PSC y la metástasis del cáncer de páncreas, y apuntan en la línea de una posible interacción entre los dos tipos celulares.

Otra línea de investigación que se ha encontrado está relacionada con la diabetes mellitus tipo 2. Lee y cols (2017), investigaron la posibilidad de que la disfunción de las células β en la diabetes mellitus tipo 2 se debiera a la activación de las PSC vecinas y concluyen que existe una relación entre ambas.

Como podemos observar existen muchas hipótesis y trabajos abiertos acerca de la biología de las PSC y su implicación en la patología pancreática, así como muchas vías para estudiar su implicación en el cáncer y pancreatitis crónica, con el fin de poder establecer en un futuro terapias efectivas.

Se sabe que la correcta organización de las respuestas celulares es de gran importancia para la función, la reparación del daño y la supervivencia celular. La alteración de las respuestas celulares puede ser la base de enfermedades inflamatorias (como la pancreatitis), el cáncer, la consecuencias funcionales derivadas del ictus, o las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, o la enfermedad de Parkinson. Dada la participación de las PSC en los procesos fibróticos que se desarrollan en el páncreas en la inflamación y en el cáncer, la posibilidad de modular su proliferación hace interesante el estudio de su fisiología.

En este trabajo fin de grado mostramos resultados preliminares que indican que es posible preparar cultivos primarios de PSC a partir de páncreas de rata. La presencia de PSC en los cultivos se comprueba con el análisis de la expresión de marcadores intracelulares específicos, desmina y GFAP. También existen otros marcadores, como se ha mencionado en la introducción, pero no se han podido determinar por falta de tiempo y de disponibilidad de los anticuerpos.

Nos han parecido interesantes los resultados de viabilidad celular obtenidos en presencia de melatonina. Dadas las acciones pleiotrópicas de esta sustancia, es muy interesante hipotizar sobre un posible efecto modulador de la proliferación celular por parte de la melatonina.

Finalmente, hemos observado cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} en respuesta a melatonina y a tapsigargina. Los resultados indican que es un modelo celular útil para el estudio de la señalización por medio de este segundo mensajero. Además, los resultados preliminares que hemos mostrado indican que la melatonina podría mediar sus acciones por la vía del Ca^{2+} intracelular en las PSC.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, estamos ante una técnica de preparación de cultivos que permite la obtención de PSC, lo que deja el campo abierto a futuras

investigaciones que permitan estudiar la fisiología de este tipo celular y su papel en las patologías que afectan a la glándula.

9. CONCLUSIONES

1. Las PSC tienen funciones importantes para la fisiología del páncreas, y son un tipo celular presente en el páncreas de rata.

2. La técnica que hemos utilizado permite la obtención de cultivos de células que expresan marcadores típicos de PSC.

3. Los cultivos de PSC preparados son útiles para el estudio de la viabilidad celular y, por tanto, para ensayos de toxicidad.

4. Los cultivos de PSC preparados son útiles para el estudio de mecanismos de señalización intracelular por la vía del Ca^{2+}.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS E INFOGRÁFICAS

Anagnostides, A., Chadwick, V. S., Selden, A. C., & Maton, P. N. (1984). Sham feeding and pancreatic secretion. Evidence for direct vagal stimulation of enzyme output. *Gastroenterology*, *87*(1), 109–114. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6724252

Apte, M.V; Phillips, P.A; Fahmy, R.G; Darby, S.J; Rodgers, S.C; McCaughan, G.W; Korsten, M. A., Pirola, R. C., Naidoo, D., & Wilson, J. S. (2000). Does Alcohol Directly Stimulate Pancreatic Fibrogenesis? Studies With Rat Pancreatic Stellate Cells, 780–794. https://doi.org/10.1053/gg.2000.5954

Apte, M. V, Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., Mccaughan, G. W., Korsten, M. A., … Wilson, J. S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas : identification , isolation , and culture, 128–133.

Babic, T., & Travagli, R. A. (2016). Neural Control of the Pancreas 2 . Sensory innervation of the pancreas 3 . Sympathetic nervous system control of the pancreas, (51).

Bachem, M. G., Schneider, E., Groß, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., … Adler, G. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, *115*(2), 421–432. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70209-4

Berridge, M J; Lipp, P; Bootman, M. D. (2000). Signal transduction. The calcium entry pas de deux, *287*, 3–4.

Berridge, J. M. (1990). Calcium Oscillations. *Biological Chemistry*, *265*(17), 9583–9588.

Birtolo, C., Pham, H., Morvaridi, S., Chheda, C., Go, V. L. W., Ptasznik, A., … Pandol, S. J. (2017). Cadherin-11 Is a Cell Surface Marker Up-Regulated in Activated Pancreatic Stellate Cells and Is Involved in Pancreatic Cancer Cell Migration. *The American Journal of Pathology*, *187*(1), 146–155. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.09.012

Brown, E. M., Leombruno, R., Thatcher, J., & Burrowes, M. (1985). The acute secretory response to alterations in extracellular calcium concentration and dopamine in perifused bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, *116*(3), 1123–1132. https://doi.org/10.1210/endo-116-3-1123

Buonanno, Andrés; Fields, R. D. (1999). Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Current Opinion in Neurobiology*, *9*(1), 110–120. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80014-2

Camello-Almaraz, C., Salido, G. M., Pariente, J. A., & Camello, P. J. (2002). Role of mitochondria in Ca2+ oscillations and shape of Ca2+ signals in pancreatic acinar cells. *Biochemical Pharmacology*, *63*(2), 283–292. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00830-9

Castiñeira, M. M. (2014). *Papel etiopatogénico del tabaco y el alcochol en los procesos de fibrogénesis pancreática asociado a pancreatitis crónica: Estudio sobre cultivo de células estrelladas pancreáticas. Tesis doctoral*.

Chandra, R., & Liddle, R. A. (2015). Regulation of Pancreatic Secretion 2 . Phases of Meal Response. https://doi.org/10.3998/panc.2015.38

Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, *410*(6824), 37–40. https://doi.org/10.1038/35065000

Chelstowska, S., Widjaja-adhi, M. A. K., & Silvaroli, J. A. (2016). Molecular Basis for Vitamin A Uptake and Storage. https://doi.org/10.3390/nu8110676

Chey, W. Y., & Chang, T. (2001). Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology*, *1*(4), 320–335. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12120211

Chey, W. Y., & Chang, T.-M. (2003). Secretin, 100 years later. *Journal of Gastroenterology*, *38*(11), 1025–1035. https://doi.org/10.1007/s00535-003-1235-3

Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, *27*(48), 6245–6251. https://doi.org/10.1038/onc.2008.301

Dong, C., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (2002). MAP KINASES IN THE IMMUNE RESPONSE. *Annual Review of Immunology*, *20*(1), 55–72. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.091301.131133

Erkan, M., Kleeff, J., Gorbachevski, A., Reiser, C., Mitkus, T., Esposito, I., … Friess, H. (2007). Periostin Creates a Tumor-Supportive Microenvironment in the Pancreas by Sustaining Fibrogenic Stellate Cell Activity. *Gastroenterology*, *132*(4), 1447–1464. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.031

Fels, B., Nielsen, N., & Schwab, A. (2016). Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of murine pancreatic stellate cells. *European Biophysics Journal*, *45*(7), 657–670. https://doi.org/10.1007/s00249-016-1176-4

Ferdek, P. E.; Jakubowska, M.A.; Gerasimenko, J.V.; Gerasimenko, O.V.; Petersen, O. H. (2011). Bile acids induce necrosis in pancreatic stellate cells dependent on calcium entry and sodium-driven bile uptake. *Molecular Microbiology*, *82*(6), 1496–1514. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07903.x

Ferdek, P. E., & Jakubowska, M. A. (2017). Biology of pancreatic stellate cells — more than just pancreatic cancer. https://doi.org/10.1007/s00424-017-1968-0

Fitzner, B., Sparmann, G., Emmrich, J., Liebe, S., & Jaster, R. (2004). Involvement of AP-1 proteins in pancreatic stellate cell activation in vitro. *International Journal of Colorectal Disease*, *19*(5), 414–20. https://doi.org/10.1007/s00384-003-0565-1

Flores-vieyra, R., Carlos, J., & Eugenia, R. M. (2005). Proteínas cinasas dependientes de Ca 2 +, *24*, 74–80.

Gázquez , A: Gómez, L; Masot, A.J; Redondo, E; Roncero, V. (2009). *Manual práctico de Histología Veterinaria*. Madrid: Librería Técnica Figueroa-2.

Gonzalez, A., Schulz, I., & Schmid, A. (2000). Agonist-evoked mitochondrial Ca2+ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, *275*(49), 38680–38686. https://doi.org/10.1074/jbc.M005667200

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(6), 3440–3450. https://doi.org/3838314

Gryshchenko, O., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., & Petersen, O. H. (2016). Calcium signalling in pancreatic stellate cells: Mechanisms and potential roles. *Cell Calcium*, *59*(2–3), 140–144. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.003

Haber, P. S., Keogh, G. W., Apte, M. V., Moran, C. S., Stewart, N. L., Crawford, D. H.

G., … Wilson, J. S. (1999). Activation of Pancreatic Stellate Cells in Human and Experimental Pancreatic Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, *155*(4), 1087–1095. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65211-X

Hama, K., Ohnishi, H., Yasuda, H., Ueda, N., Mashima, H., Satoh, Y., … Sugano, K. (2004). Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *315*(4), 905–911. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.155

Hansen, N. U. B., Genovese, F., Leeming, D. J., & Karsdal, M. A. (2015). The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Experimental and Molecular Pathology*, *98*(2), 286–294. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.006

Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L., & Jia, Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *The EMBO Journal*, *18*(24), 6880–6889. https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6880

Ide, T., Kitajima, Y., Miyoshi, A., Ohtsuka, T., Mitsuno, M., Ohtaka, K., … Miyazaki, K. (2006). Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *International Journal of Cancer*, *119*(12), 2750–2759. https://doi.org/10.1002/ijc.22178

Inoue, K., Ohtsuka, H., Tachikawa, M., Motoi, F., Shijo, M., Douchi, D., … Terasaki, T. (2017). MK2461, a Multitargeted Kinase Inhibitor, Suppresses the Progression of Pancreatic Cancer by Disrupting the Interaction Between Pancreatic Cancer Cells and Stellate Cells. *Pancreas*, *46*(4), 557–566. https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000778

Jaster, R., Lichte, P., Fitzner, B., Brock, P., Glass, A., Karopka, T., … Liebe, S. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *9*(3), 670–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16202214

Jaster, R., Sparmann, G., Emmrich, J., & Liebe, S. (2002). Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut*, *51*(4), 579–584. https://doi.org/10.1136/gut.51.4.579

Jaworek, J; Nawrot-Porabka, K; Leja-Szpak, A; Konturek, S. J. (2010). BRAIN-GUT AXIS IN THE MODULATION OF PANCREATIC ENZYME SECRETION 1. *Advances in Animal and Veterinary Science*, *3*(6), 523–531. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000692

Johnson, L.J; Dyer, R; Hupe, D. . (1998). Matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *2*(4), 466–471. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80122-1

Jun, I., Lee, M. G., & Muallem, S. (2017). Molecular Mechanisms of Pancreatic Bicarbonate Secretion 2 . Control Secretion of Pancreatic 3 . Key Transporters Involved in. https://doi.org/10.3998/panc.2017.01

Karin, M., Liu, Z. g, & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *9*(2), 240–246. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80068-3

Keane, M. P., Strieter, R. M., & Belperio, J. A. (2005). Mechanisms and mediators of pulmonary fibrosis. *Critical Reviews in Immunology*, *25*(6), 429–463. https://doi.org/1b0356b42a8fd5b5,5e8465d26d674ad0 [pii]

Kikuta, K., Masamune, A., Satoh, M., Suzuki, N., Satoh, K., & Shimosegawa, T.

(2006). Hydrogen peroxide activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in pancreatic stellate cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *291*(1–2), 11–20. https://doi.org/10.1007/s11010-006-9189-4

Kikuta, K., Masamune, A., Satoh, M., Suzuki, N., & Shimosegawa, T. (2004). 4-Hydroxy-2, 3-nonenal activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World Journal of Gastroenterology*, *10*(16), 2344–2351. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4344659607&partnerID=40&md5=07393944ddccec2917c7d433fadf97d2

Klöppel, G., & Maillet, B. (1992). The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, *420*(1), 1–4. https://doi.org/10.1007/BF01605976

Konturek, S.J; Yanaihara, N; Pawlik, W; Jaworek, J; Szewczyk, K. (1989). Comparison of helodermin, VIP and PHI in pancreatic secretion and blood flow in dogs. *Regulatory Peptides*, *24*(2), 155–166. https://doi.org/10.1016/0167-0115(89)90234-6

Konturek, S. J., Dembinski, A., Krol, R., & Wunsch, E. (1990). Effects of an Antral Mucosectomy, L-364,718 and Atropine on Cephalic Phase of Gastric and Pancreatic Secretion in Dogs. *Gastroenterologyy*, *39*, 47–55. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=792984

Konturek, S. J., Dubiel, J., & Gabry, B. (1969). Effect of acid infusion into various levels of the intestine on gastric and pancreatic secretion in the cat, 749–753.

Konturek, S. J., Pepera, J., Zabielski, K., Konturek, P. C., Pawlik, T., Szlachcic, A., & Hahn, E. G. (2003). Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *54*(3), 293–317.

Koong, A. C., Mehta, V. K., Le, Q. T., Fisher, G. A., Terris, D. J., Brown, J. M., … Vierra, M. (2000). Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *48*(4), 919–922. https://doi.org/10.1016/S0360-3016(00)00803-8

Lachowski, D., Cortes, E., Pink, D., Chronopoulos, A., Karim, S. A., P. Morton, J., & del Río Hernández, A. E. (2017). Substrate Rigidity Controls Activation and Durotaxis in Pancreatic Stellate Cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 2506. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02689-x

Lee, E., Ryu, G. R., Ko, S.-H., Ahn, Y.-B., & Song, K.-H. (2017). A role of pancreatic stellate cells in islet fibrosis and β-cell dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *485*(2), 328–334. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.082

Li, N., Li, Y., Li, Z., Huang, C., Yang, Y., Lang, M., … Ren, H. (2016). Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) Recruits Macrophage to Activate Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 1–12. https://doi.org/10.3390/ijms17060799

Liddle, R. A. (2012). Regulation of Pancreatic Secretion. In J. Johnson, FKG; Kaunitz, JD; Merchant, JL; Said, HM; and Wood (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (pp. 1425–1460). London: Academic Press.

Lim, D., Fedrizzi, L., Tartari, M., Zuccato, C., Cattaneo, E., Brini, M., & Carafoli, E. (2008). Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(9), 5780–5789. https://doi.org/10.1074/jbc.M704704200

Liu, H. Y., Greene, T., Lin, T. Y., Dawes, C. S., Korc, M., & Lin, C. C. (2016). Enzyme-mediated stiffening hydrogels for probing activation of pancreatic stellate

cells. *Acta Biomaterialia*, *48*, 258–269. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.027

Liu, Y. (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*, *69*(2), 213–217. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000054

Lizarazo, J. I. (2008). Fisiopatología de la pancreatitis crónica, 6–9.

Longnecker, D. (2014). Anatomy and Histology of the Pancreas, 1–26. https://doi.org/10.3998/panc.2014.3

Love, J. A; Yi, E; Smith, T. G. (2007). Autonomic pathways regulating pancreatic exocrine secretion. *Autonomic Neuroscience*, *133*(1), 19–34. https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2006.10.001

Masamune, Atsushi; Kikuta, Kazuhiro; Watabane, Takashi; Satoh, K. S. A. S. T. (2008). Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors, 352–362. https://doi.org/10.1007/s00535-008-2162-0

Masamune, A. (2005). Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells. *World Journal of Gastroenterology*, *11*(22), 3385. https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i22.3385

Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Kume, K., & Shomosega wa, T. (2003). Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of Rat Pancreatic Stellate Cells.

Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Sakai, Y., Satoh, A., & Shimosegawa, T. (2002). Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-γ block activation of pancreatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(1), 141–147. https://doi.org/10.1074/jbc.M107582200

Masamune, A., Watanabe, T., Kikuta, K., Satoh, K., & Shimosegawa, T. (2008). NADPH oxidase plays a crucial role in the activation of pancreatic stellate cells, 99–108. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00272.2007.

Mayoral, A. (2013). *Tema 11.- Duodeno y páncreas* (pp. 1–9).

McCarroll, J. A., Phillips, P. A., Park, S., Doherty, E., Pirola, R. C., Wilson, J. S., & Apte, M. V. (2003). Pancreatic Stellate Cell Activation by Ethanol and Acetaldehyde: Is it Mediated by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway? *Pancreas*, *27*(2), 150–160. https://doi.org/10.1097/00006676-200308000-00008

McCarroll, J. a, Phillips, P. a, Santucci, N., Pirola, R. C., Wilson, J. S., & Apte, M. V. (2006). Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut*, *55*(1), 79–89. https://doi.org/10.1136/gut.2005.064543

Megías, M; Molist, P; Pombal, M. A. (2007). Atlas de Histología Vegetal y Animal: Técnicas histológicas. 5. Inmunocitoquímica. In *Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. España.* Retrieved from https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php

Missiaen, L., Robberecht, W., Bosch, L. V. Den, Callewaert, G., Parys, J. B., Wuytack, F., … Smedt, H. D. (2000). Abnormal intracellular Ca2+homeostasis and disease. *Cell Calcium*, *28*(1), 1–21. https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0131

Nakamura, T., Yoshikawa, T., Noguchi, N., Sugawara, A., Kasajima, A., Sasano, H., & Yanai, K. (2014). The expression and function of histamine H3 receptors in pancreatic beta cells. *British Journal of Pharmacology*, *171*(1), 171–185. https://doi.org/10.1111/bph.12429

New, M., Acker, T. Van, Long, J. S., Sakamaki, J., & Ryan, K. M. (2017). Molecular Pathways Controlling Autophagy in Pancreatic Cancer, *7*(March), 1–11.

https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00028

Nielsen, SF; Thastrup, O; Pedersen, R; Olsen, CE; Christensen, S. (1995). Structure-activity relationships of analogues of thapsigargin modified at O-11 and O-12. *J Med Chem., Jan*, 20;38(2):272-276.

Nielsen, N., Lindemann, O., & Schwab, A. (2014). TRP channels and STIM/ORAI proteins: Sensors and effectors of cancer and stroma cell migration. *British Journal of Pharmacology*, *171*(24), 5524–5540. https://doi.org/10.1111/bph.12721

Ohnishi, H., Miyata, T., Yasuda, H., Satoh, Y., Hanatsuka, K., Kita, H., … Sugano, K. (2004). Distinct Roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent Pathways in Transforming Growth Factor-b1. Regulation of Pancreatic Stellate Cellular Functions. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 8873–8878. https://doi.org/10.1074/jbc.M309698200

Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W., & Pandol, S. J. (2007). Review series The pancreatic stellate cell : a star on the rise in pancreatic diseases, *117*(1). https://doi.org/10.1172/JCI30082.50

Pandol, S. J., Schoeffield, M. S., Sachs, G., & Muallem, S. (1985). Role of free cytosolic calcium in secretagogue-stimulated amylase release from dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(18), 10081–10086.

Pang, T. C. Y., Wilson, J. S., & Apte, M. V. (2017). Pancreatic stellate cells: what's new? https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000378

Petersen, O. H. (2009). Ca2+ signaling in pancreatic acinar cells: physiology and pathophysiology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, *42*(1), 9–16. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219293

Phillips, P. a, Yang, L., Shulkes, A., Vonlaufen, A., Poljak, A., Bustamante, S., … Wilson, J. S. (2010). Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(40), 17397–402. https://doi.org/10.1073/pnas.1000359107

Pozzan, T; Rizzuto, R; Volpe, P; Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews, 74 (3)*, 595–637.

Redondo, E. (2013). Tema 32: Aparato digestivo (V): Órganos anejos al aparato digestivo.

Rembold, C. M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *20*(2), 129–37. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1639454

Rickmann, M., Vaquero, E. C., Malagelada, J. R., & Molero, X. (2007). Tocotrienols Induce Apoptosis and Autophagy in Rat Pancreatic Stellate Cells Through the Mitochondrial Death Pathway. *Gastroenterology*, *132*(7), 2518–2532. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.107

Robinson, B. K., Cortes, E., Rice, A. J., Sarper, M., & del Río Hernández, A. (2016). Quantitative analysis of 3D extracellular matrix remodelling by pancreatic stellate cells. *Biology Open*, *5*(6), 875–882. https://doi.org/10.1242/bio.017632

Roy, S. S., & Hajnóczky, G. (2008). Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods*, *46*(3), 213–223. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.024

Sada, M., Ohuchida, K., Horioka, K., Okumura, T., Moriyama, T., Miyasaka, Y., …

Nakamura, M. (2016). Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. *Cancer Letters*, *372*(2), 210–218. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.016

Salido, G.M; Singh, J; Camello, P. J. (1999). Factores de crecimiento y páncreas exocrino. *Growth (Lakeland)*, 77–81.

Santofimia-Castaño, P; Garcia-Sanchez, L; Ruy, DC; Fernandez-Bermejo, M; Salido, GM; Gonzalez, A. (2014). The seleno-organic compound ebselen impairs mitochondrial physiology and induces cell death in AR42J cells. *Toxicol Lett., Sep*, 17;229(3):465-73.

Saotome, T., Inoue, H., Fujimiya, M., Fujiyama, Y., & Bamba, T. (1997). Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas*, *14*(4), 373–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163784

Sastre, J., Sabater, L., & Aparisi, L. (2005). Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterología Y Hepatología*, *28*(Supl 2), 3–9. https://doi.org/10.1157/13071380

Schneider, E., Schneider, E., Schmid-Kotsas, A., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Zhao, J., … Bachem, M. G. (2001). Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *281*(2), C532-43. Retrieved from http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11443052&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/1A2880C6-27B4-4B76-958C-A459133D6B5F

Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J., & Stock, C. (2012). Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration. *Physiological Reviews*, *92*(4), 1865–1913. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2011

Semenza, G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Blood*, *88*, 1474–1480.

Shek, F. W.-T., Benyon, R. C., Walker, F. M., McCrudden, P. R., Pender, S. L. F., Williams, E. J., … Iredale, J. P. (2002). Expression of Transforming Growth Factor-β1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis. *The American Journal of Pathology*, *160*(5), 1787–1798. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61125-X

Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*, *23*(48), 8017–8023. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208159

Singer, M.V; Niebergall-Roth, E. (2009). Secretion from acinar cells of the exocrine pancreas: Role of enteropancreatic reflexes and cholecystokinin. *Cell Biology International*, *33*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/J.CELLBI.2008.09.008

Singh, J., & Pearson, G. T. (1984). Effects of nerve stimulation on enzyme secretion from the in vitro rat pancreas and 3H-release after preincubation with catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *327*(3), 228–233. https://doi.org/10.1007/BF00502454

Smaili, S. S., Hsu, Y. Te, Youle, R. J., & Russell, J. T. (2000). Mitochondria in Ca2+ signaling and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *32*(1), 35–46. https://doi.org/10.1023/A:1005508311495

Storck, H., Hild, B., Schimmelpfennig, S., Sargin, S., Zaccagnino, A., Budde, T., … Schwab, A. (2017). Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration, *8*(1), 769–784.

Takikawa, T., Masamune, A., Yoshida, N., Hamada, S., Kogure, T., & Shimosegawa, T.

(2017). Exosomes Derived From Pancreatic Stellate Cells. *Pancreas*, *46*(1), 19–27. https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000722

Thastrup, O; Dawson, AP; Scharff, O; Foder, B; Cullen, PJ; Drøbak, B. B., & PJ; Christensen, SB; Hanley, M. (1994). Thapsigargin, a novel molecular probe for udying intrastcellular calcium release and storage. *Agents Actions.*, *Dec;*, 43(3-4):187-93.

Thorn, P. (1993). SPATIAL ASPECTS OF Ca 2 + SIGNALLING IN PANCREATIC, *184*, 129–144.

Tjomsland, V., Pomianowska, E., Aasrum, M., Sandnes, D., Verbeke, C. S., & Gladhaug, I. P. (2016). Profile of MMP and TIMP Expression in Human Pancreatic Stellate Cells: Regulation by IL-1α and TGFβ and Implications for Migration of Pancreatic Cancer Cells. *Neoplasia (United States)*, *18*(7), 447–456. https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.06.003

Tontonoz, P., & Spiegelman, B. M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPARγ. *Annual Review of Biochemistry*, *77*(1), 289–312. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829

Watanabe, S., Nagashio, Y., Asaumi, H., Nomiyama, Y., Taguchi, M., Tashiro, M., … Otsuki, M. (2004). Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, *287*(6), G1175–G1181. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00339.2004

Watari, N., Hotta, Y., & Mabuchi, Y. (1982). Morphological its Complex Studies with Vitamin Pancreatic on a Vitamin following Observed Excess Cell in Mouse and Macrophage Tissues A Administration By NAKAZO WATARI , YASUAKI HOTTA and YOSHIO MABUCHI The First Department of Anatomy , Nagoya City Univer. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, *58*(4–6), 837–58. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7122019

Williams, J. A. (2017). Regulation of Normal and Adaptive Pancreatic Growth 2 . Measurement of Pancreatic Size 3 . Prenatal Pancreatic Growth, (141). https://doi.org/10.3998/panc.2017.02

Xu, X., Lozinskaya, I., Costell, M., Lin, Z., Ball, J. A., Bernard, R., … Schnackenberg, C. G. (2013). Characterization of Small Molecule TRPC3 and TRPC6 agonist and Antagonists. *Biophysical Journal*, *104*(2), 454a. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.2513

Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E. D., Ichihara, S., & Inagami, T. (2000). Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, *35*(1 Pt 2), 313–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642317

Yokota, T., Denham, W., Murayama, K., Pelham, C., Joehl, R., & Bell, R. H. (2002). Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *The Journal of Surgical Research*, *104*(2), 106–11. https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6403

Yule, D. I. (2015). Ca 2+ Signaling in Pancreatic Acinar Cells, *3*(28). https://doi.org/10.3998/panc.2015.24

Yule, D. I., & Gallacher, D. V. (1988). Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Letters*, *239*(2), 358–362. https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80951-7

Yurchenco, P. D., & Patton, B. L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(12), 1277–94. https://doi.org/10.2174/138161209787846766

11. ICONOGRAFÍA Y ANEXOS

11.1. Figuras:

Figura 1: Dibujo de un páncreas normal y sus conductos pancreáticos. De Longnecker, 2014

Figura 2 : Esquema del riego arterial del páncreas. Elaboración propia

Figura 3:Dibujo de un corte histológico del páncreas. Modificado de (Omary y cols, 2007).

Figura 4: Dibujo de la estructura de una célula acinar. Modificada de Sastre y cols, 2005.

Figura 5: Dibujo esquemático de la estructura de un acino pancreático. Modificado de Omary y cols, 2007.

Figura 6 : Mecanismo de secreción hidroelectrolítica en las células ductales del páncreas. Efecto de la secretina. AC: anhidrasa carbónica. CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. (Sastre y cols, 2005).

Figura 7: [Ca2+], medido en una sola célula acinar pancreática superfundida a 30 ° C. ACh (10-7 M) ha inducido cambios oscilatorios en la [Ca2+]i. (Yule y Gallacher, 1988).

Figura 8: Cambios en [Ca2+]i provocados por concentraciones máximas de secretagogos en células acinares individuales. Se observa un aumento brusco de [Ca2+]i que posteriormente disminuye a un nuevo nivel de meseta. (Yule, 2015)

Figura 9:Esquema del mecanismo de acoplamiento para la regulación de la entrada de Ca2+ en las células. (A) El retículo endoplasmático (ER) contiene el receptor de inositol trisfosfato (InsP3R) (rojo), que interactúa con los canales SOC en la membrana plasmática (azul). (B) Después de la adición del inhibidor de la fosfatasa calyculin A, se forma una matriz densa del citoesqueleto justo debajo de la membrana plasmática, que desplaza el ER y altera la interacción molecular entre los SOC y los InsP3R. (C) El vaciado de las reservas internas de Ca2+ en el ER genera un cambio conformacional (CC) en los lnsP3R que se combinan con los SOC. (Berridge y cols, 2000)

Figura 10: Mecanismo de activación de la vía AMPc. Fuente: https://es.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling

Figura 11 : Esquemática de los componentes celulares del páncreas exocrino. Presencia de células estrelladas (color verde) en los espacios periacinar y periductal. (Omary y col., 2007)

Figura 12 : Esquema representativo de las rutas de señalización implicadas en la activación de las células estrelladas pancreáticas. (Castiñeira, 2014)

Figura 13 : Mecanismos de activación de las PSCs. (Lizarazo, 2008)

Figura 14: ratitas Wistar de unos 5-7 días de edad, nacidas y criadas en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura.

Figura 15: Documento de recogida de animales en el Servicio de Animalario de la UEx.

Figura 16: Medio de cultivo 199 (GIBCO).

Figura 17: Cultivo primario de PSC en placa de 35 mm sobre cubre estéril.

Figura 18: Inmunocitoquímica indirecta y enzimática. Incubación con una solución de bloqueo que satura los sitios de unión inespecífica. Unión de los anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa, lavado con tampón fosfato y reacción enzimática. (Megías y cols, 2007).

Figura 19: Inmunocitoquímica fluorescente e indirecta. Detección simultánea de dos moléculas situadas en una misma sección mediante inmunofluorescencia. La razón

de que los dos anticuerpos primarios procedan de dos animales diferentes es que los anticuerpo secundarios, obtenidos de otro animal, normalmente cabra u oveja, inmunizados con las inmunoglobulinas de ratón y conejo, respectivamente, es lo que permite a cada anticuerpo secundario reconocer y unirse a un anticuerpo primario determinado y no al otro. (Megías y cols, 2007).

Figura 20: Microscopio de fluorescencia de la unidad de fisiología animal. Facultad de veterinaria. Uex.

Figura 21: Intercambio de una placa a otra de la solución celular

Figura 22: Pocillos sobre marco listos para medir en el lector

Figura 23: Lector de placas ELISA.

Figura 24: Equipamiento de la sala para medición de fluorescncia. De izquierda a derecha: monocromador, microscopio de fluorescencia y ordenador con software para análisis de imágenes.

Figura 25: Imagen al microscopio óptico de PSC en cultivo primario.

Figura 26: Immunocitoquímica de PSC. Presencia de filamentos de desmina (A) y GFAP (B).

Figura 27: Histograma que muestra la viabilidad de las PSC incubadas en presencia de melatonina 1 mM durante 24-96 horas.

Figura 28: Histograma que muestra la viabilidad de las PSC incubadas en presencia de tapsigargina 1mM durante 24-96 horas.

Figura 29: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la estimulación de PSC con tapsigargina.

Figura 30: Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la estimulación de PSC con melatonina 1 mM.

11.2. Tablas

Tabla 1: Composición de la solución Na-H para aislamiento de células

Tabla 2:Composición de la solución TIM

Tabla 3: Composición del medio de cultivo 199 reconstituido.

Tabla 4:Composición de la solución PBS.

Tabla 5: Preparación de la Solución A para PB.

Tabla 6: Preparación de la solución B para PB.

Tabla 7:: Preparación de PBS

Tabla 8: Resumen protocolo inmunocitoquímica

Tabla 9: Estimulación de células según las distintas concentraciones de melatonina para el estudio de viabilidad.

Tabla 10: Composición de la solución Na-H para experimentos

12. AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:

En primer lugar, al Dr. D. Antonio González Mateos, tutor de este trabajo, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, en la Universidad de Extremadura, quien me dio la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia y la investigación, por su confianza y ayuda diaria, así como su correctísima dirección de este trabajo.

Dña. Ana María Moreno, técnico de laboratorio de la Unidad de Fisiología, por su paciencia inagotable, su entusiasmo, su energía diaria y por todas las horas de trabajo que hemos compartido juntas.

El resto de los becarios, profesores y personal de la Unidad de Fisiología, por enseñarme a querer saber cada día más.

Todas las personas, compañeros y amigos, que con su callada colaboración, su apoyo constante, su trato amable y su disponibilidad, han contribuido al estímulo necesario para que este trabajo fuese posible.

Toda mi familia, que dan sentido a mi vida y a los que ofrezco este trabajo como símbolo de la finalización de mis estudios en el grado de Veterinaria.