



TESIS DOCTORAL

**Biomarcadores de la respuesta celular al estrés oxidativo
en presencia de antioxidantes en varios modelos
celulares**

Patricia Santofimia Castaño

Departamento de Fisiología

Conformidad del Director:

Fdo: Dr. Antonio González Mateos

2014



FACULTAD DE VETERINARIA
**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA**
Avda. Universidad s/n E-10071-
Cáceres Apdo. Correos 643
Teléfono: 927 257000 (esxt.
51377) Fax: 927 257110
E-Mail: agmateos@unex.es

D. Antonio González Mateos, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

INFORMA

Que la presente memoria presentada por Dña. Patricia Santofimia Castaño, con el título **“Biomarcadores de la respuesta celular al estrés oxidativo en presencia de antioxidantes en varios modelos celulares”**, ha sido realizada bajo mi dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura. Durante el período de realización de la Tesis, la doctoranda realizó una estancia de tres meses en la Universidad de Bremen en Bremen (Alemania). La Tesis ha sido informada favorablemente por dos expertos Europeos en el área de Fisiología. Por ello considero que la Tesis reúne todos los requisitos establecidos para ser juzgada y optar a la mención “Doctor Europeo” y autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Cáceres, a 9 de diciembre de 2014.

Este trabajo de investigación ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos:

- PLAN REGIONAL DE INVESTIGACIÓN SANITARIA 2010 (PRIS10014).

- Junta de Extremadura-FEDER (GR10010).

- Patricia Santofimia Castaño ha sido beneficiaria de una ayuda para la formación predoctoral de investigadores (PD10058) del Gobierno de Extremadura (Consejería de Empleo, Empresa e Innovación y Fondo Social Europeo).



AGRADECIMIENTOS

Como todo tiene un principio y un final, esta Tesis no iba a ser menos, y estos cuatro años de formación han dado su fruto. Para ello, he necesitado muchas horas de trabajo y esfuerzo para verla terminada y tenerla entre mis manos. En primer lugar, tengo que decir que estos años han sido un periodo maravilloso y lleno de experiencias gratificantes en este “mundillo”, en los que he vivido momentos muy felices dentro y fuera del laboratorio. Pero el dicho de que “la paciencia es la madre de la ciencia” es lo que mejor aprendemos los de este gremio cuando entramos en un laboratorio. El problema es que cuando los experimentos no salen como deberían, a veces la perdemos, juntos con las esperanzas y las ganas de seguir; pero como soy una chica con suerte, tengo a mi alrededor personas estupendas a las que quiero agradecer su apoyo incondicional.

En primer lugar y de forma muy especial quiero agradecerse a mi Tutor de Tesis, Antonio. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí estos últimos años desde que entré como alumna interna en el Departamento. Muchas gracias por tu ayuda, por todo lo que me has enseñado, por la confianza que has depositado en mí, por tus ánimos y por permitirme dedicarme a algo que me encanta. Pero también por los buenos ratos en el laboratorio, en las clases o en los congresos. Sin duda, como jefe, has puesto el listón muy alto.

Por supuesto, quiero mostrar mi agradecimiento a Ginés. Gracias por acogerme en el Departamento desde el primer momento, por tus buenos consejos y dedicación, por ayudarme siempre que has podido y por interesarte por cómo iban los experimentos. Me llevo unos recuerdos estupendos de esta etapa gracias a ti.

Gracias también a los compañeros del Departamento de Fisiología con los que he compartido despacho y laboratorio, aunque muchos ya no estéis; en especial a los que me habéis ayudado con los experimentos de esta Tesis: Lourdes, Ana y Deborah. A los demás, Carmen, Tapia, Álvaro, Esther, Pedro, Inés, Rosado, Isaac, JJ, Leticia, Inés, Alejandro, Natalia y Myriam, gracias por enseñarme en el laboratorio, prestarme el típico reactivo de última hora o simplemente, por todo el tiempo compartido en el

Departamento. Cómo no, a Mercedes, por su labor como técnico y tu forma de ser tan especial, que nos alegra el día un poquito. Muy especialmente quiero dale las gracias a los chicos del Departamento Fisiología de Badajoz, los dos congresos que hemos pasado juntos han sido fantásticos, gracias por adoptarme como una más, sois una gente estupenda.

Asimismo, quiero dar las gracias a los compañeros del Departamento de Inmunología, a Bea, Juan y Raquel, por ayudarme con los experimentos de esta Tesis, enseñarme y permitirme usar sus instalaciones.

Sin duda, quiero agradecer al Profesor Ralf Dringen el permitirme realizar mis estancias en su laboratorio de la Universidad de Bremen. Fue una experiencia muy enriquecedora, tanto a nivel profesional como personal que nunca olvidaré. También me gustaría dar las gracias a todos los miembros del grupo, en especial, a Felix, Yvonne, Maria, Charlotte, y Michaela, que me enseñaron y acogieron como a una más del grupo y con los que compartí un estupendo día a día. Danke schön.

A mis padres, Maribel y José, y a mi hermano Samuel; por lo mucho que os quiero y porque sois la mejor familia que se pueda tener. Os doy las gracias por haberme cuidado, querido y educado como lo habéis hecho, sin vuestro apoyo y esfuerzo no hubiera llegado donde estoy. Gracias por haberme enseñado todos los valores que han hecho de mí la persona que soy.

También quiero agradecerse a mis tíos, Pilar y Antonio, a quienes me gustaría tener más cerca, gracias por preocuparos tanto por mí. También al resto de mi familia, que me anima y me apoya desde la distancia.

A todos mis amigos, en especial a Estefi, pero también a Yolanda, María y Mar por esos días de becarias en los que arreglábamos el mundo o también organizábamos las Jornadas Veterinarias; gracias por los cafés, las cervezas, los momentos “mari”, la migas y por supuesto, los gintonics; los pasados y los que nos quedan. Me llevo los mejores recuerdos de estos cuatro años en la Facultad y me alegro de haberlos podido compartir con vosotras, os deseo mucha suerte. Muchas gracias a los amigos que dejé en tierras alemanas, en especial a Álvaro, Gisela y Carmen (grazie mille), vosotros hicisteis de esos tres meses una experiencia inolvidable. Gracias también a Diego y

Jarita, por vuestro apoyo, vuestra amistad, las risas, los días de cañas, y por prometerme que quemaríais cosas por mí.

También a mi gata Panchi, por esos abrazos peludos que quitan tantos estreses.

Y por último muchisisisisimas gracias a Pepe, mi mejor amigo y el amor de mi vida. Gracias por tu amor, tu cariño y tu apoyo incondicional; tus ánimos a todas horas, tu ayuda y tu paciencia, por aguantarme en los días malos y disfrutar a mi lado los increíblemente buenos; en definitiva, por quererme y hacerme tan feliz. Gracias por estos años a tu lado y los que nos quedan, te quiero. También quiero dar las gracias a tus padres, María y Vicente; tus hermanas, Jara y Alba y toda tu familia, por su cariño y ánimos.

“Hay magia cuando sigues luchando más allá de tu resistencia, la magia de darlo todo por un sueño, que nadie más ve, aparte de ti” ***Million Dollar Baby***

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

- γ GCL: γ -glutamil cisteína ligasa.
- $[Ca^{2+}]_i$: Concentración de calcio libre intracelular.
- $[Ca^{2+}]_m$: Concentración de calcio libre mitocondrial.
- AA: Ácido araquidónico.
- AC: Adenilato ciclasa.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADP: Dinucleótido de adenosina fosfato.
- ADPRc: Difosfato de adenosina ribosa cíclica
- AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina
- AG: Aparato de Golgi
- AMPA: Receptor ionotrofo sensible al agonista ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato.
- AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: ARN mensajero.
- ATF: factor activador de transcripción
- ATP: Trifosfato de adenosina.
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- cADPR: ribosa ADP cíclica.
- CICR: liberación de calcio inducida por calcio.
- CoA: Coenzima A.
- CRAC: Corrientes activadas por la liberación de Ca^{2+} .
- CREB: Proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc.
- CYP2E1: Citocromo P4502E1.
- DAG: 1, 2 diacilglicerol.
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- EAAT: Transportador de aminoácidos excitatorios
- ECC: Entrada capacitativa de calcio.

- EDTA: Ácido etilen diamino tetracético.
- ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
- ERN: Especies reactivas de nitrógeno.
- ERO: Especies reactivas de oxígeno.
- FBS: Suero bovino fetal.
- GABA: Ácido γ -aminobutírico.
- GC: Guanilato ciclasa.
- GDP: Difosfato de guanosina.
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial.
- Gi: Proteína G inhibidora.
- GLAST-1: Transportador de L-glutamato/L-aspartato
- GLT-1: Transportador glial de L-glutamato
- GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico.
- GS: Glutación sintetasa.
- Gs: Proteína G estimuladora.
- GSH: Forma reducida de glutación.
- GSSG: Forma oxidada de glutación.
- GTP: Trifosfato de guanosina.
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
- HBSS: Hank's Balanced Salts.
- HEPES: ácido N-[Hidroietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico].
- HIOMT: hidroxindol-O-metil transferasa.
- I(1,3,4,5)P₄: Inositol 1,3,4,5-tetrafosfato.
- I(1,3,4,5)P₄R: Receptor de inositol 1,3,4,5-tetrafosfato.
- IP₃: Inositol-1,4,5- trifosfato.
- IP₃R: Canal iónico-receptor de IP₃.
- JNK: quinasa N-terminal de c-Jun (también denominada proteína quinasa activada por estrés o SAPK).
 - KA: Ácido kaínico.
 - MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos.
 - MAPKAP: proteína quinasa activada por MAP quinasas

- MAPKK: Proteína quinasa de MAPK.
- MAPKKK: Proteína quinasa quinasa de MAPK.
- mGluR: Receptor de glutamato metabotropo
- MKK o MEK: MAPK/ERK quinasa.
- NAADP: Nicotinato de adenina dinucleótido fosfato.
- NADP: Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato.
- NADPH: Nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida).
- NAT: N-acetil-transferasa.
- NMDA: N-metil-D-aspartico.
- NO: Óxido nítrico.
- $O_2^{\cdot -}$: Anión superóxido.
- OH^{\cdot} : Radical hidroxilo.
- ONOO $^{\cdot}$: Peroxinitrito.
- PA: Ácido fosfatídico.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- PC: Fosfatidilcolina.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- Pfkfb3: 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3
- PG: Prostaglandinas.
- PGI: Prostaciclinas.
- PI(3,4,5)P₃: Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato.
- PI(4,5)P₂: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato.
- PI: Ácido fosfatídico.
- Pi: Fosfato inorgánico.
- PI₃K: Fosfatidilinositol-3-cinasa.
- PIP: Fosfatidilinositol.
- PKA: Proteína cinasa A.
- PKC: Proteína cinasa C.
- PKG: Proteína cinasa G
- PLA₂: Fosfolipasa A₂.
- PLC: Fosfolipasa C.

- PLD: Fosfolipasa D.
- PMCA: Bomba Ca^{2+} ATPasa de membrana plasmática.
- Ppi: Pirofosfato.
- Ras: proteína G específica de GTPasa
- RE: Retículo endoplasmático
- Redox: óxido-reducción
- ROR: Retinoid Orphan Receptors.
- rpm: Revoluciones por minuto.
- RyR: receptor de rianodina
- RZR: Retinoid Z Receptors.
- SEM: Error estándar de la media.
- SERCA: Bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico.
- SNARE (soluble NSF-anchorage protein receptors): proteína de anclaje de N-metilmaleimide soluble.
- SNC: Sistema nervioso central.
- SOCs: canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática activados por el

vaciamiento de los depósitos intracelulares.

- SOD: Superóxido dismutasa.
- STIM-1: molécula de interacción del estroma-1.
- TRPCs: transient receptor potential channels.
- TX: Tromboxanos.
- VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

Índice

1	Introducción	21
2	Antecedentes bibliográficos	31
2.1	Hipocampo	32
2.1.1	Principales tipos celulares en el hipocampo	33
2.1.2	Conexiones neuronales en el hipocampo	34
2.1.3	Principales conexiones aferentes y eferentes del hipocampo	34
2.1.4	Mecanismos moleculares de la memoria explícita e implícita	35
2.2	Células de glía	37
2.2.1	Los astrocitos	37
2.2.2	Funciones de los astrocitos en el sistema nervioso central	40
2.3	Señalización neuroglial	46
2.3.1	Receptores de glutamato presentes en los astrocitos	47
2.4	Páncreas	50
2.5	El acino pancreático	52
2.6	Control de la secreción pancreática exocrina	54
2.6.1	Control nervioso	55
2.6.2	Control humoral	55
2.6.3	Receptores y señalización transmembrana	57
2.6.4	Exocitosis de las enzimas digestivas	58
2.7	Descripción de la línea celular tumoral pancreática AR42J	59
2.8	Mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta	61
2.8.1	Proteínas G	61
2.8.2	Adenilato ciclasa y AMPc	63
2.8.3	Guanilato ciclasa y GMPc	63
2.8.4	Fosfolipasa A ₂ (PLA ₂) y ácido araquidónico	64
2.8.5	Fosfolipasa C (PLC) e inositol trifosfato (IP ₃)	65
2.8.6	Fosfolipasa D (PLD)	65
2.8.7	Proteínas cinasas	66
2.8.8	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).	67
2.8.8.1	MAPKs que fosforilan el extremo N-terminal de c-Jun	68
2.8.8.2	MAPKs reguladas por factores extracelulares (ERKs)	69
2.8.8.3	MAPKs activadas por mitógenos de 38 KDa o p38 MAPKs	70
2.9	Señalización celular mediada por el ion Ca²⁺	72
2.9.1	Depósitos de calcio intracelulares	73
2.9.1.1	Retículo endoplásmico	73
2.9.1.2	Mitocondria.	75
2.9.1.3	Aparato de Golgi.	76
2.9.1.4	Vesículas secretoras.	77
2.9.2	Liberación de Ca ²⁺ desde los depósitos intracelulares	77
2.9.2.1	Canal iónico-receptor de IP ₃	78
2.9.2.2	Canal iónico-receptor de rianodina	78
2.9.2.3	Canal iónico-receptor de NAADP	79
2.9.3	Entrada de Ca ²⁺ desde el exterior celular	79

2.9.3.1	Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por voltaje	80
2.9.3.2	Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por receptor	80
2.9.3.3	Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por segundos mensajeros	81
2.9.3.4	Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados mecánicamente	81
2.9.3.5	Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por el vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca^{2+}	81
2.9.4	Mecanismos de salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática	82
2.9.4.1	El intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$	82
2.9.4.2	Bomba Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA)	83
2.9.4.3	Bomba Ca^{2+} -ATPasa del RE	83
2.10	Estrés oxidativo	84
2.10.1	Radicales libres	85
2.10.2	Especies reactivas de oxígeno.	86
2.10.3	Mitocondria y ERO	89
2.10.4	Sistema nervioso y estrés oxidativo	90
2.10.5	Páncreas y estrés oxidativo	93
2.10.6	Mecanismos fisiológicos de detoxificación de ERO en astrocitos	95
2.10.7	Mecanismos fisiológicos de detoxificación de ERO en el páncreas exocrino	99
2.11	Antioxidantes	100
2.11.1	Ebselén	102
2.11.2	Melatonina	106
2.11.2.1	Biosíntesis de melatonina	107
2.11.2.2	Mecanismos de acción	109
2.11.2.3	Mecanismos y función antioxidante de la melatonina	111
3	Objetivos	117
4	Material y métodos	121
4.1	Lista de reactivos	122
4.2	Animales de estudio	124
4.3	Aislamiento de los hipocampos y preparación de los cultivos de astrocitos	125
4.3.1	Material y soluciones	125
4.3.2	Preparación de los cultivos	128
4.4	Aislamiento de las células acinares pancreáticas y preparación de los cultivos celulares	131
4.4.1	Aislamiento de las células acinares pancreáticas y preparación de cultivos	131
4.5	Cultivo celular de la línea celular tumoral pancreática AR42J.	133
4.5.1	Obtención de la línea celular.	133
4.5.2	Método de cultivo.	133
4.6	Determinación de la viabilidad y proliferación celular.	134
4.7	Determinación de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular	135
4.7.1	Carga con el indicador	136
4.7.2	Cuantificación de la fluorescencia del fura-2	137

4.8	Determinación de la secreción de amilasa	139
4.9	Concentración de calcio mitocondrial	142
4.10	Potencial de membrana mitocondrial	143
4.11	Localización de la mitrocondria	143
4.12	Determinación de actividad caspasa-3	144
4.13	Análisis de la fase de ciclo celular	145
4.14	Tratamiento estadístico de los resultados.	146
5	<u>Resultados</u>	<u>149</u>
5.1	Melatonin modulates Ca ²⁺ mobilization and amylase release in response to cholecystokinin octapeptide in mousepancreatic acinar cells	151
5.2	Pharmacological dose of melatonin reduces cytosolic calcium load in response to cholecystokinin in mouse pancreatic acinar cells	163
5.3	Ebselen alters mitochondrial physiology and reduces viability of rat hippocampal astrocytes	175
5.4	The seleno-organic compound ebselen impairs mitochondrial physiology and induces cell death in AR42J cells	185
6	<u>Discusión</u>	<u>195</u>
7	<u>Conclusiones</u>	<u>209</u>
8	<u>Bibliografía</u>	<u>215</u>

1 Introducción

Introducción

En la actualidad, existe en nuestra sociedad un interés creciente con respecto a los antioxidantes. Este interés ha sido impulsado por la industria, desde la que se promociona el mensaje de que los antioxidantes son moléculas seguras y dadoras de salud cuando son ingeridos como suplementos o en alimentos enriquecidos.

Una de las teorías del envejecimiento más extendidas es la “Teoría de los radicales libres”, propuesta por Harman en 1956 y que está basada en el siguiente fundamento *“El envejecimiento resulta de los efectos nocivos generados por los radicales libres que se producen en el curso del metabolismo celular normal y que son acumulados a lo largo de toda la vida de un organismo”*.

Podríamos definir antioxidante como aquella sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo en una molécula concreta. De esta forma, las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias no han desaprovechado la oportunidad de publicitar que las moléculas antioxidantes pueden retrasar el envejecimiento y prolongar la esperanza de vida. Por lo que hoy en día, tenemos a nuestra disposición multitud de cosméticos, suplementos y nutracéuticos enriquecidos con antioxidantes.

Los antioxidantes pueden ser de origen sintético o natural. Los antioxidantes sintéticos son muy utilizados por la industria alimenticia debido a su alto grado de estabilidad, eficacia y ventaja económica. Por otro lado, y este hecho es muy interesante, existen compuestos con actividad antioxidante en los alimentos vegetales, y se considera que son uno de los principales responsables de su efecto promotor de la salud. Las propiedades biológicas de los antioxidantes están determinadas tanto por su estructura química, como por la cantidad consumida y su biodisponibilidad, entendida ésta última como la parte de un nutriente que el cuerpo digiere, absorbe y utiliza en sus funciones fisiológicas. Absorbidos en el tracto digestivo pueden llegar a toda la economía orgánica, incluyendo el sistema nervioso central, al ser capaces de atravesar en algunos casos la barrera hematoencefálica.

Desde hace algún tiempo se utilizan sustancias con capacidad antioxidante como protectores en procesos patológicos ya instaurados, en los que subyace el estrés oxidativo. Además, los alimentos que contienen antioxidantes de forma natural pueden ayudar a mantener un buen estado de salud y retrasar la aparición de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de estos efectos positivos, los antioxidantes podrían resultar

perjudiciales, ya que no se conocen exactamente los efectos beneficiosos, se desconocen las dosis adecuadas y sus objetivos moleculares no están del todo esclarecidos. Es por ello importante prestar especial atención a los efectos que puedan tener estas sustancias sobre el organismo, fundamentalmente desde el punto de vista de su utilización en la terapia preventiva o curativa.

El Ca^{2+} es uno de los mensajeros intracelulares más ampliamente distribuidos en el reino animal. Desde hace tiempo, se han llevado a cabo estudios sobre la homeostasis del Ca^{2+} en un amplio número de tipos celulares. La organización temporal y espacial de las señales intracelulares de Ca^{2+} representan un sistema de señalización celular universal, y la homeostasis del Ca^{2+} es vital para la supervivencia celular debido a las múltiples funciones celulares que gobierna. Se ha propuesto desde hace algún tiempo que las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} , particularmente un aumento excesivo y prolongado en su concentración citoplasmática, constituyen una señal inicial que participa en el desarrollo de procesos patológicos en diferentes tejidos. Dichos procesos conducen a la instauración de diversas patologías (pancreatitis, diabetes, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas, etc.) y finalmente a la muerte celular.

El páncreas exocrino es un modelo establecido para el estudio de los mecanismos de transducción de señales intracelulares y la regulación de la secreción exocrina. La función primordial del páncreas exocrino es la secreción (mediante exocitosis) de enzimas digestivas, proceso que se inicia por el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y por la activación de numerosas proteínas dependientes de Ca^{2+} .

Por otro lado, los astrocitos son el tipo de célula de glía predominante en el sistema nervioso central, y están íntimamente asociados con las neuronas. Secretan sustancias neuroactivas que les permiten comunicarse con astrocitos y neuronas vecinas, siendo por ello capaces de regular la actividad neuronal y la neurotransmisión. Hoy día se sabe que los astrocitos tienen la capacidad de regular la actividad de neuronas vecinas, y se ha postulado que pueden proteger a las neuronas frente al estrés oxidativo. Sin embargo, los astrocitos se activan en procesos patológicos, y pueden por ello contribuir a, o incluso reforzar, los procesos inflamatorios. Los astrocitos decaen en su papel neuroprotector y las neuronas son así más vulnerables a la acción de neurotoxinas, incluyendo citocinas proinflamatorias y radicales libres. Al igual que en el

Introducción

páncreas exocrino, los astrocitos utilizan la señalización del Ca^{2+} para regular un amplio espectro de respuestas fisiológicas, y para la comunicación entre neuronas y glía, y viceversa.

Los astrocitos comparten con las células exocrinas pancreáticas la particularidad de ser células no excitables eléctricamente, que responden a la activación de sus receptores de membrana por hormonas y neurotransmisores, que utilizan la vía de señalización del Ca^{2+} para regular sus funciones, y que la liberación de neurotransmisores se produce por exocitosis.

El estrés oxidativo es un fenómeno que se refiere a las consecuencias, tanto químicas como bioquímicas, derivadas de una sobreproducción de radicales libres, que da lugar a la génesis de procesos patológicos. Un gran número de patologías tienen como base el estrés oxidativo, al cual se ha relacionado con los procesos de envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, y los daños celulares derivados de estados isquémicos y de hipoxia. Sin embargo, sus objetivos moleculares no están del todo esclarecidos. Las investigaciones actuales han permitido establecer una relación entre la aparición de alteraciones en la homeostasis del ion Ca^{2+} y la generación de radicales libres. En condiciones normales, la célula cuenta con sistemas de defensa para hacer frente a los radicales libres, pero cuando se produce un desequilibrio entre su producción y las defensas antioxidantes de la célula, con predominio de los primeros, se desencadena el estrés oxidativo.

Los astrocitos, como las células pancreáticas, son vulnerables al estrés oxidativo y cuentan con diversos sistemas para el control del estado de óxido-reducción (redox), presentando cadenas de señalización intracelular potencialmente implicadas en la génesis y establecimiento de los procesos inflamatorios y del cáncer. Adicionalmente, los dos sistemas celulares pueden ver amenazada su homeostasis cuando la señalización por Ca^{2+} está alterada.

En general, es de esperar un efecto protector por los antioxidantes; sin embargo, la posibilidad de que actúen como prooxidantes es inherente a su estructura y a sus características físico-químicas.Cuál de los modos de acción predominará dependerá de factores que no conocemos aún, y que están siendo objeto de estudio actualmente. Desde luego, las acciones prooxidantes de estas sustancias son deseables en un

contexto oncológico, con una acción dirigida a la muerte de las células malignas, pero no son deseables estas acciones en células sanas. Así, la ingesta de antioxidantes puede disminuir el riesgo de ciertas patologías, pero se sospecha que la suplementación a altas dosis con preparados de antioxidantes puede resultar contraproducente.

En la presente Tesis examinaremos las acciones de diferentes antioxidantes, naturales y sintéticos, sobre la viabilidad y la funcionalidad en el páncreas exocrino, en astrocitos y células tumorales AR42J. Prestaremos especial atención a los cambios inducidos por diversos antioxidantes sobre la viabilidad celular, el ciclo celular, la homeostasis del ion Ca^{2+} , la fisiología mitocondrial y los procesos secretores.

INTRODUCTION

Nowadays, in our society an increasing interest on antioxidants exists. This interest has been provided by food industry, from which the message that, when taken as supplements or included in fortified foods, antioxidants are safe molecules and the role of these compounds as health providers has been promoted.

One of the major theories that are trying to explain aging is the so called "Theory of free radicals", proposed by Harman in 1956. This theory is based on the following rationale: *"Aging is a consequence of the harmful effects caused by free radicals that are produced in the course of cellular metabolism and which accumulate in the body along the life of an organism."*

An antioxidant can be defined as a compound that delays, prevents or eliminates the oxidative damage on a particular molecule. In this line, pharmaceutical, cosmetic and food industries have seized an opportunity to announce that antioxidants can delay aging and enlarge life expectancy. Therefore, we can find anywhere a wide array of cosmetics, supplements and nutraceuticals that include antioxidants in their composition.

The antioxidants employed can have a natural origin or can be synthesized in the lab. Synthetic antioxidants are widely used by food industry because of its high stability and effectiveness, and also provide an economic advantage in comparison with natural antioxidants. On the other hand, and this fact is very interesting, there are compounds with antioxidant activity contained in plant foods, which are considered the major promoters of their beneficial effect on health. The biological properties of antioxidants largely depend on their chemical structure, the amount that is taken up, and by its bioavailability; the latter represents the quantity of a nutrient that the body digests, absorbs and is used in the body in its physiological functions. Once they have been absorbed in the digestive tract, antioxidants can reach the whole body. Because some of them can cross the blood brain barrier, antioxidants can be delivered into the central nervous system.

Introducción

To date, substances exhibiting antioxidant effects have been employed in the treatment of pathological processes already established, in which oxidative stress has been considered an underlying condition. Additionally, it is thought that foods containing natural antioxidants may help maintaining a healthy body and can delay the onset of disease. However, despite the positive effects that have been reported, antioxidants might be harmful, because the benefits are not totally clarified, the appropriate doses are unknown and their molecular targets are not completely identified. It is therefore important to pay special attention to the effects that these compounds can exert on the body, mainly from the point of view of its use in the treatment of illness.

Ca^{2+} is the intracellular second messenger most widely distributed in the animal kingdom. Along decades, studies on Ca^{2+} homeostasis have been carried out in a wide range of cell types. The spatiotemporal organization of intracellular Ca^{2+} signals represents a universal cell signaling system, and Ca^{2+} homeostasis is critical for cell survival, because numerous cellular functions are regulated by the ion. Some time ago it has been suggested that the impairment of Ca^{2+} homeostasis, particularly an excessive and maintained increase in its cytoplasmic concentration, represents an early signal that is involved in the development of deleterious processes affecting different tissues. Such processes lead to the progress of several diseases (pancreatitis, diabetes, hypertension, neurodegenerative diseases, etc.) and eventually lead to cell death.

The exocrine pancreas is a well established model that has been used for the study of the mechanisms involved in intracellular signal transduction and in the regulation of exocrine secretion. The primary function of the exocrine pancreas is the secretion of digestive enzymes. This process is initiated by the increase of intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and by the secondary activation of numerous Ca^{2+} -dependent proteins.

Astrocytes are the most abundant glial cell type in the central nervous system, and are intimately associated with neurons. They secrete neuroactive substances that allow them to communicate with neighboring neurons and also other astrocytes. Thus, astrocytes might regulate neuronal activity and neurotransmission. Actually, it is known that astrocytes can regulate the activity of neighboring neurons, and it has been

suggested that they protect neurons against oxidative stress. Nevertheless, astrocytes become activated in pathological processes, and can thus contribute to, or even aggravate, inflammatory processes. Astrocytes may drop their neuroprotective role, and neurons become thus more vulnerable to the action of neurotoxins, including proinflammatory cytokines and free radicals. Astrocytes employ Ca^{2+} signaling to regulate a wide range of physiological responses, as it occurs in the exocrine pancreas, and also use Ca^{2+} for the communication with other cell types within the central nervous system.

Astrocytes depict, as exocrine pancreatic cells also do, the common characteristic of being a non-electrically excitable cell type, the ability to show cellular responses upon activation of cell membrane receptors by hormones and neurotransmitters, the fact that Ca^{2+} signaling pathway regulates their functions, and that the release of neurotransmitters is carried out by exocytosis.

Oxidative stress is a term that refers to the consequences, both chemical and biochemical, derived from an overproduction of free radicals, which may result in the genesis of disease. An array of diseases is generated on the basis of an oxidative stress, which has been linked to aging, neurodegenerative disorders, and the cellular damage derived from hypoxia and ischemic conditions. However, the molecular targets of free radicals are not completely understood. Current research has established a relationship between the impairment of Ca^{2+} homeostasis and the generation of free radicals. Under physiological conditions, the cell counts with defense systems to deal with free radicals, but when there is an imbalance between oxidants production and the antioxidant defenses, favorable to free radicals accumulation, oxidative stress is then triggered.

Astrocytes, and also pancreatic cells, are vulnerable to oxidative stress and display diverse mechanisms that are responsible for controlling the oxidation-reduction (redox) state of the cellular systems. These cell types possess intracellular signaling cascades that are potentially involved in the genesis and the development of inflammatory processes and cancer. Additionally, the homeostasis of the two cell types can be damaged when Ca^{2+} signaling is impaired.

By and large, a protective effect of antioxidants could be expected; however, the likelihood that these compounds might behave as pro-oxidants is inherent to their

Introducción

structure and physicochemical characteristics. The prevailing behavior depends on factors that are not well known yet, and that are being currently studied. Definitely, the pro-oxidant actions of these compounds are desirable in a tumor environment, in which their effects are directed towards the death of malignant cells; however, these effects are not desirable in healthy cells. In this line, it is presumed that regular antioxidant intake may reduce the risk of suffering certain diseases, but it is also possible that supplementation with antioxidant at high doses could have the opposite effect.

In this PhD thesis we will examine the effects of different antioxidants on cell viability and function, employing exocrine pancreatic cells, hippocampal astrocytes and AR42J tumor cells as cellular models. We will pay major attention to the changes induced by various antioxidants on cell viability, the cell cycle, Ca^{2+} homeostasis, mitochondrial physiology and the secretory processes.

2 Antecedentes bibliográficos

2.1 Hipocampo

El hipocampo es una porción de la corteza cerebral altamente distintiva y estructurada, integrado en lo que se conoce como sistema límbico (figura 1). Es compacto, elongado e incurvado, con forma de caballito de mar en primates, a lo que debe su nombre, dado por el anatomista del siglo XVI Giulio Cesare Aranzio; en el caso de los roedores posee forma aplanada. Hay dos hipocampos, cada uno localizado en cada hemisferio cerebral. Se encuentran bajo el neocórtex, en la cara basomedial del lóbulo temporal anterior y protruyen lateralmente dentro del asta temporal del ventrículo lateral. Se subdivide en: hipocampo propiamente dicho (también denominado *cornu ammonis* o Asta de Ammon), giro dentado y complejo subicular. El hipocampo es una estructura cerebral implicada en el aprendizaje y la memoria (Taupin 2007), se sabe que esta región está asociada con el procesamiento e integración de estímulos, facilitando la memoria espacial, el aprendizaje relacional y la memoria explícita (Gärtner y Frantz 2010).

El aprendizaje relacional es una forma evolucionada de adaptación al medio que se basa en evaluaciones e inferencias conscientes entre informaciones diversas. Requiere, por tanto, interacciones complejas entre las diferentes zonas de procesamiento cerebral de información, especialmente entre la neocorteza y el denominado lóbulo temporal medial. Este último incluye la formación hipocampal (hipocampo propiamente dicho, circunvolución dentada, subículo y corteza entorrinal) y las cortezas parahipocampal y perirrinal adyacentes. Lesiones en esta región del cerebro están relacionadas con problemas en la consolidación del aprendizaje; por ejemplo, ratas a las que se ha lesionado el hipocampo de manera intencionada muestran dificultades a la hora de discernir un mismo estímulo aplicado en condiciones diferentes, es decir, sólo pueden reconocer dicho estímulo si éste se presenta exactamente en las condiciones originales (por ejemplo, si el mismo estímulo es aplicado en un lugar distinto a la primera vez, éste no será reconocido). Este hecho ha llevado a proponer al hipocampo, no exactamente como el lugar donde se almacena el aprendizaje, sino más bien como una región que integra diferentes tipos de estímulos facilitando el proceso anterior. De esta forma el hipocampo funcionaría como un sistema preciso de

interconexión de percepciones que, combinadas, constituirían un recuerdo completo (Duvernoy 2005).

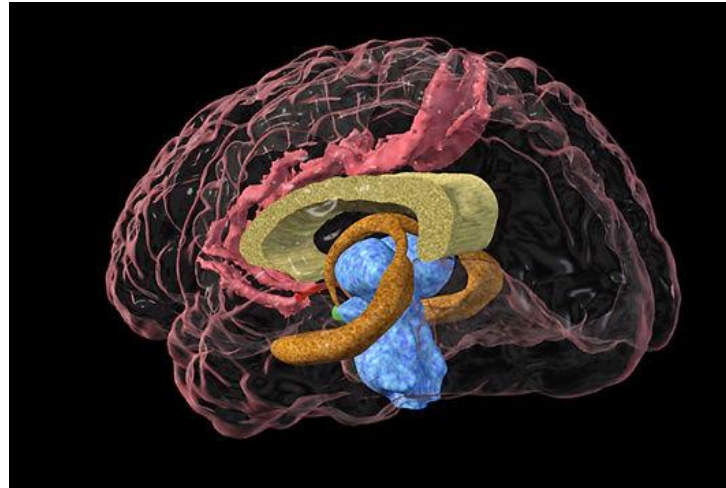


Figura 1. Sistema límbico humano. Imagen coloreada captada por resonancia magnética donde se observan las partes que conforman el sistema límbico, el hipocampo y el fórnix (marrón), el cuerpo calloso (amarillo), el tálamo (azul) y el giro cingulado (rosa).

2.1.1 Principales tipos celulares en el hipocampo

Se pueden diferenciar dos grupos principales de células que forman parte de la materia nerviosa en el hipocampo: neuronas y células de glía. El hipocampo se divide en varias zonas de células piramidales, que se llaman regiones CA (CA1-CA4). La circunvolución dentada y el hipocampo son regiones corticales con tres capas. Las células granulares ocupan la circunvolución dentada y las células piramidales son las principales neuronas en las regiones CA del hipocampo.

Los procesos de consolidación de memoria y aprendizaje están mediados por mecanismos moleculares que conducen a un fenómeno de potenciación a largo plazo y posterior plasticidad de los anteriores grupos neuronales. La acción de estímulos sucesivos sobre las neuronas granulares del giro dentado conduce a una mayor liberación de neurotransmisor por parte de éstas y, por tanto, a una mayor estimulación de las neuronas siguientes de la cadena, las piramidales CA3 y, en definitiva, a una mayor estimulación de las últimas en el circuito, las piramidales CA1.

2.1.2 Conexiones neuronales en el hipocampo

En el hipocampo existe un sistema interno de circuitos que se conecta con la corteza entorrinal. Las neuronas piramidales de esta corteza envían axones hacia las dendritas de las células granulares de la circunvolución dentada. Estos axones de las células granulares (fibras musgosas) establecen sinapsis con las dendritas de las células piramidales de CA3. Las células piramidales de CA3 emiten proyecciones hacia las dendritas de las células piramidales en CA1 (colaterales de Schaffer) y CA2. Los axones de las células piramidales CA1 se proyectan hacia las neuronas piramidales del subículo y el subículo manda proyecciones axonales hacia las neuronas piramidales de la corteza entorrinal. Este flujo de información forma un circuito interno. Existen múltiples interconexiones, superpuestas a este circuito, con regiones de asociación de la neocorteza y otras estructuras del prosencéfalo límbico. Las neuronas del subículo y las neuronas piramidales de CA1 y CA3 emiten axones hacia el fórnix, además de proyecciones eferentes hacia las estructuras diana. El subículo envía también axones hacia la amígdala y las áreas de asociación del lóbulo temporal (Felten y Shetty 2010).

2.1.3 Principales conexiones aferentes y eferentes del hipocampo

Las neuronas piramidales del subículo y de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo conforman el fórnix eferente. El subículo proyecta axones hacia los núcleos hipotalámicos (sobre todo los núcleos mamilares) y talámicos a través del fórnix poscomisural. Las neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo emiten axones hacia los núcleos septales, el núcleo *accumbens*, las regiones hipotalámicas anterior y preótica, la corteza del cíngulo y las áreas de asociación del lóbulo frontal. Los axones colinérgicos aferentes de los núcleos septales atraviesan el fórnix para inervar la circunvolución dentada y las regiones CA del hipocampo. Las aferencias masivas llegan al hipocampo a partir de las cortezas de asociación sensitivas, las cortezas de asociación polisensoriales, las cortezas prefrontal e insular, los núcleos amigdalinos y el bulbo olfatorio a través de proyecciones hacia la corteza entorrinal. La corteza entorrinal está totalmente integrada en el circuito interno del hipocampo. El subículo está conectado de

forma recíproca con la amígdala y también envía axones hacia las áreas de asociación corticales en el lóbulo temporal (Matthews 2001).

2.1.4 Mecanismos moleculares de la memoria explícita e implícita

La memoria explícita es la adquisición de información acerca de objetos, estímulos e información que se percibe de forma consciente y que se puede recordar; incluye datos sobre acontecimientos personales, conocimiento de hechos e información sobre la cual tiene lugar una valoración cognitiva. En los recuerdos explícitos participan estructuras del lóbulo temporal medial, incluido el hipocampo. La memoria implícita es el proceso de aprendizaje sobre la realización de tareas o adquisición de habilidades, que no se pueden recordar mediante procesos conscientes. Este tipo de memoria depende de otros circuitos cerebrales y no se pierde en las formas clásicas de lesiones del hipocampo. La recuperación de los recuerdos explícitos depende de la recuperación de información almacenada en el cerebro e implica la reconstrucción dependiente de las percepciones sensitivas. La memoria explícita necesita de la formación de nuevas conexiones sinápticas y la expresión génica de nuevos conjuntos de proteínas neuronales (Neves y cols., 2008).

En este proceso subyace una facilitación de aquellos circuitos que son más estimulados, de forma que la respuesta neuronal consiste en adaptarse para responder aún mejor a dichos estímulos. Si esos estímulos son lo suficientemente persistentes sucede que, aparte de liberar una mayor cantidad de neurotransmisor, esas neuronas pueden incrementar el número de sinapsis, es decir, de contactos entre ellas (lo que se conoce como plasticidad); es de esta forma como parecen mantenerse las experiencias y recuerdos en el sistema nervioso central (Wang y cols., 2006). Pues bien, el neurotransmisor puesto en juego por este circuito es el glutamato, que puede actuar con efectos inmediatos sobre receptores de tipo ionotrope (NMDA y AMPA/Kainato) o bien actuar sobre receptores de tipo metabotropo, acoplados a proteínas G o receptores del tipo tirosina cinasa, dando lugar a la generación de segundos mensajeros como monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) a través de la adenil ciclasa, inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) a través de la fosfolipasa C (PLC), con o la

Antecedentes bibliográficos

consecuente movilización de iones calcio (Ca^{2+}) (el cual puede actuar sobre cinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina, estimular el movimiento de vesículas de secreción, etc.) (Sanderson y Dell'Acqua 2011). Estos efectos metabotropos, en principio, no son tan rápidos como los ionotropos (prácticamente inmediatos); en cambio, las consecuencias a las que conduce la señalización metabotrópica son más persistentes en el tiempo, y van enfocadas a la modulación de la excitabilidad de la neurona sobre la que actúan. De esta forma, cuando los estímulos son persistentes en este circuito neural, la acción metabotrópica prolongada puede no solamente afectar a la liberación inmediata de neurotransmisor que conlleva la transmisión del impulso nervioso, sino también profundizar hasta la información genética de dicha neurona (a través del reclutamiento de factores de transcripción como CREB-1) para que se lleve a cabo la expresión de “genes tempranos”, cuyo papel consiste en hacer que esa célula se vuelva más excitable durante más tiempo (Rinaldi y cols., 2012).

Un buen ejemplo es la expresión de genes de ubiquitinización que degradan las subunidades reguladoras de la proteína cinasa A (PKA), haciéndolas independientes de AMPc; la PKA tiene implicaciones en la fosforilación de canales rectificadores de potasio (K^+), disminuyendo su probabilidad de apertura y, por tanto, permaneciendo la neurona despolarizada durante un mayor tiempo. Estos procesos hacen que, sin necesidad de que aumente la cantidad de neurotransmisor secretado, la respuesta a éste sea mayor en la neurona sobre la que actúa; en eso consiste la potenciación. Si esta potenciación persiste como consecuencia de que los estímulos que la han provocado aún se mantienen, se reclutarán en última instancia factores de transcripción a través de los segundos mensajeros anteriores, (que son codificados por los genes tempranos como proteína de unión a CREB: C/EBP), que expresan “genes tardíos”, y que dan lugar a la formación de nuevas sinapsis, dando lugar al fenómeno denominado anteriormente plasticidad (Nguyen y Woo 2003).

Éste es el comportamiento existente entre las neuronas del circuito del hipocampo, desde las granulares del giro dentado a las piramidales CA1, pasando por las piramidales CA3. Por último, cabe destacar el papel de segundos mensajeros difusibles, como óxido nítrico (NO), en los fenómenos de potenciación, pues en estos procesos se activa la óxido nítrico sintasa y el NO puede actuar como señalizador retrógrado desde

las neuronas CA1 a las CA3 para una mayor liberación de glutamato por parte de estas últimas (Felten y Shetty 2010).

2.2 Células de glía

Aunque las neuronas son las principales protagonistas en el funcionamiento del sistema nervioso, éstas últimas no podrían llevar a cabo su papel sin el apoyo de las menos conocidas células gliales. Ya Santiago Ramón y Cajal, gracias a sus observaciones con tinciones desarrolladas por él mismo, como la técnica del sublimado de oro, atribuyó a estas células la posibilidad de desempeñar un importante papel más allá de ser un mero soporte estructural. Sin embargo, la carencia durante casi un siglo de técnicas apropiadas para el estudio de la señalización intracelular, relegó a estas células a un segundo plano (Araque 2008).

Dentro de la glía se pueden establecer dos grupos celulares atendiendo al tamaño celular. Por un lado la microglía, constituida por células de origen mesodérmico y representada por fagocitos mononucleares cerebrales, es decir, células residentes del sistema inmune. El otro grupo es el denominado macroglía, constituido por los oligodendrocitos y los astrocitos, que son células con diversas funciones, aunque en general todas ellas desempeñan una función de soporte y apoyo a las neuronas. Los oligodendrocitos son células responsables de la formación de la vaina de mielina en el sistema nervioso central (SNC), equivalente a las células de Schwann en el sistema nervioso periférico. Por último, los astrocitos desempeñan un papel que ha sido y es actualmente objeto de intenso estudio y sobre el que hablaremos a continuación (Castellano y Nieto-Sampedro 2001).

2.2.1 Los astrocitos

Las células de la astrogliá son de origen neuroectodérmico. Al igual que las neuronas, se localizan tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, y forman poblaciones diferentes y características para cada centro nervioso. Entre ellas, las más

Antecedentes bibliográficos

conspicuas son los astrocitos. Otras células de estirpe astrogial tienen características propias: las células de Bergman del cerebelo, las células de Müller en la retina, la glía radial, la glía limitans, la glía periganglionar, etc.

Todas estas células de estirpe astrogial se pueden detectar mediante anticuerpos específicos frente a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (figura 2), un filamento intermedio de 51 kDa muy abundante en el citoesqueleto de estas células gliales, la proteína s100 (Tateishi y cols., 2006), que se encuentra asociada frecuentemente a astrocitos aunque no es específica, las enzimas glutamina-sintetasa y anhidrasa carbónica (marcador de todo el conjunto de células gliales) (Patel y cols., 1985; Svichar y cols., 2006); por último, estas células pueden ser fuente de ON, en diversas circunstancias (Amitai 2010). Existe una última forma de diferenciar los astrocitos de otro tipo celular vecino y es por su respuesta movilizada de Ca^{2+} ante soluciones con bajo contenido en K^+ , tanto en cortes de hipocampo como en cultivos de astrocitos, respuesta que no se ha observado en neuronas (Beck y cols., 2004; Dallwig y Deitmer 2002; Gonzalez y cols., 2006a).

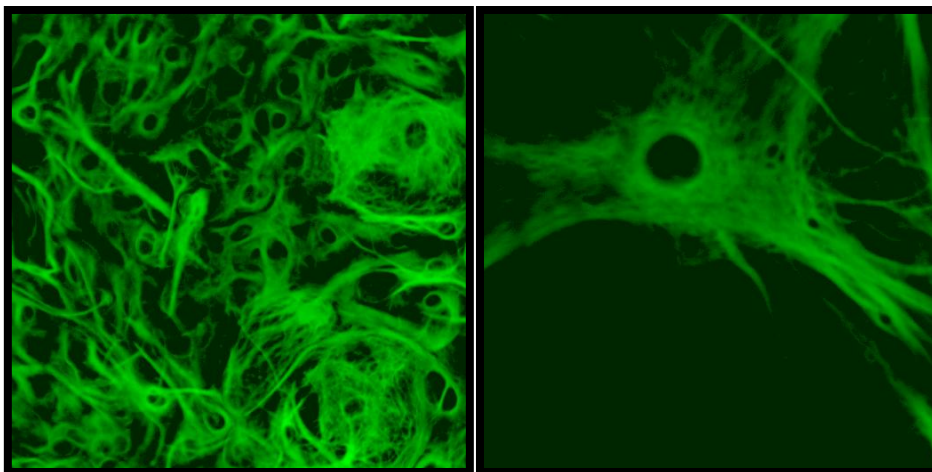


Figura 2. *Inmunocitoquímica en astrocitos incubados con anticuerpos anti-GFAP. Imagen tomada mediante microscopía confocal láser.*

Los astrocitos son células con morfología estrellada, muy ramificada. Al microscopio óptico presentan dos características diferenciales: la presencia de pies perivasculares (con morfología similar a una maza o pedicelo), que envuelven a los

capilares sanguíneos del tejido nervioso, como se verá posteriormente, y la formación de la membrana limitante superficial glial, que define la frontera entre el tejido nervioso y las meninges.

Entre los astrocitos se pueden distinguir dos poblaciones diferenciadas; por un lado los astrocitos fibrosos o fibrilares, que se encuentran en la sustancia blanca. Tienen pocas ramificaciones y su cuerpo celular es largo y liso. Presentan un núcleo regular, nucleolo poco patente y carioplasma bastante denso, con la envoltura nuclear dilatada. Por otro lado se distinguen los astrocitos protoplásmicos, que se pueden ver en la sustancia gris. Tienen la superficie de su cuerpo celular y sus ramificaciones muy irregulares, debido a que se encuentran en un medio muy poblado de neuronas y por tanto han tenido que adaptarse morfológicamente a esa carencia de espacio (Verkhatsky y Butt 2007).

En general, el citoplasma de los astrocitos presenta un retículo endoplasmático (RE) y un aparato de Golgi (AG) no excesivamente desarrollados. Se observan mitocondrias grandes y muy abundantes, y en la matriz citoplasmática hay acúmulos de glucógeno. En las ramificaciones, pero menos en el cuerpo celular, presentan haces de filamentos intermedios o gliofilamentos. Los astrocitos inmaduros poseen pocos gliofilamentos y muchos microtúbulos en su citoplasma. Asimismo, el número de gliofilamentos de vimentina (otra proteína fibrilar de astrogliá) es mayor que el de GFAP. Además, los filamentos de GFAP se encuentran en exclusiva alrededor del núcleo. En cambio, los astrocitos maduros poseen muchos gliofilamentos y pocos microtúbulos; además, los gliofilamentos de GFAP son más abundantes que los de vimentina y se encuentran distribuidos por todo el cuerpo celular y las ramificaciones. En las prolongaciones de los astrocitos maduros, además de gliofilamentos de GFAP, también se puede encontrar gran cantidad de mitocondrias y acúmulos de glucógeno (Gomes y cols., 1999).

La membrana plasmática de los astrocitos presenta abundantes zonas de especialización. Hay zonas de unión estrecha con otros astrocitos a través de conexones, hexámeros de conexina que forman un canal que comunica los citoplasmas de células vecinas (*gap junctions* o uniones GAP), a través de los que pueden circular libremente iones y moléculas de bajo peso molecular entre células adyacentes. De esta forma las

células astrogliales forman una red acoplada iónicamente en condiciones normales. Otras zonas de especialización importantes son las *puncta adherentia* sobre las que convergen elementos del citoesqueleto, y que confieren propiedades de sostén del parénquima nervioso (Hatton y Parpura 2004).

2.2.2 Funciones de los astrocitos en el sistema nervioso central

Los astrocitos son un subtipo de células gliales a las que, en la actualidad, no solo se le atribuyen funciones tróficas, estructurales y de apoyo para las neuronas, sino que existe una nueva visión en la que las células gliales son elementos activos, implicados en la fisiología del sistema nervioso. Los astrocitos son responsables de una gran variedad de funciones complejas y esenciales en la fisiología del SNC y representan la mayor población de células en el SNC.

Los astrocitos desempeñan un papel importante en formación de la barrera hematoencefálica. Los podocitos de los astrocitos se encuentran adyacentes a las células endoteliales y participan en la formación de la barrera hematoencefálica. En la separación del parénquima nervioso del medio sanguíneo intervienen tres elementos estructurales: el endotelio de los capilares, la lámina basal de los capilares y los podocitos (figura 3). Esta estrecha relación entre las células endoteliales de los capilares del cerebro y los podocitos es la vía de comunicación entre el torrente sanguíneo y el SNC (Goldstein 1988). La barrera hematoencefálica protege al cerebro de las fluctuaciones en la composición del plasma y distintos agentes de la circulación, tales como hormonas, sustancias de desecho o xenobióticos, que pueden perturbar la función neuronal e incluso comprometer su supervivencia; de esta forma se mantiene un microambiente en el SNC que permite que la actividad de las neuronas sea coordinada (Abbott 2002). Esta función está relacionada con la regulación del flujo sanguíneo en el cerebro. Los astrocitos están en contacto con los vasos sanguíneos y neuronas, y controlan los cambios en flujo sanguíneo local en respuesta a la mayor o menor actividad neuronal (Sofroniew y Vinters 2010). Cuando aumenta la actividad sináptica, se incrementa la concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en los astrocitos, y se estimula la liberación de trifosfato de adenosina (ATP) y de glutamato. El ATP interviene

en la propagación de la señal de Ca^{2+} entre astrocitos adyacentes en lo que se ha llamado olas de Ca^{2+} , e induce la respuesta cerebrovascular aumentando el flujo sanguíneo en esa zona (Carmignoto y Gomez-Gonzalo 2010; Jakovcevic y Harder 2007).

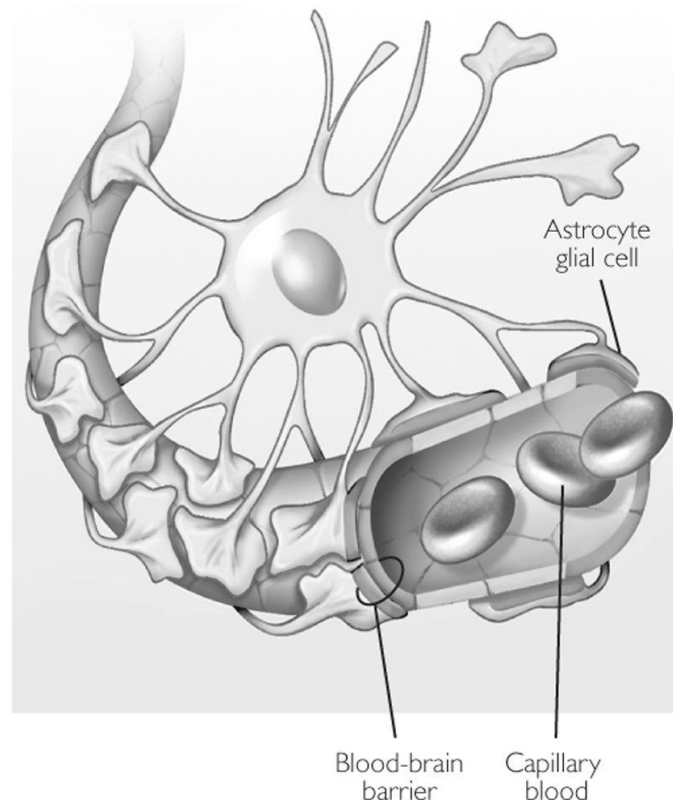


Figura 3. Componentes de la barrera hematoencefálica

Los astrocitos tienen la función de proporcionar sustratos metabólicos a las neuronas desde los vasos sanguíneos, dependiendo de la actividad neuronal. Los astrocitos movilizan el glucógeno de sus reservas energéticas en los momentos de mayor actividad neuronal, liberando al medio extracelular los metabolitos de la actividad glucogenolítica (Forsyth 1996). Por otra parte, la glucosa entra en el interior celular a través de los transportadores específicos de glucosa (GLUTs) siendo esta fosforilada por la hexoquinasa para producir glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato puede seguir tres vías de metabolización tal y como aparece en la figura 4: glucólisis (seguidamente se produce lactato o se metaboliza en la mitocondria), la ruta de las pentosas fosfato o glucogenogénesis (Belanger y cols., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, una característica especial de los astrocitos es la presencia de *gap junctions*, una vía directa para la comunicación intercelular entre astrocitos. Estas uniones permiten el tráfico intercelular de glucosa y sus derivados (glucosa-6-fosfato, lactato...) (Taberero y cols., 2006). En el cerebro, cerca del 85% del consumo de glucosa tiene lugar en la glucólisis aerobia en los astrocitos, que genera lactato.

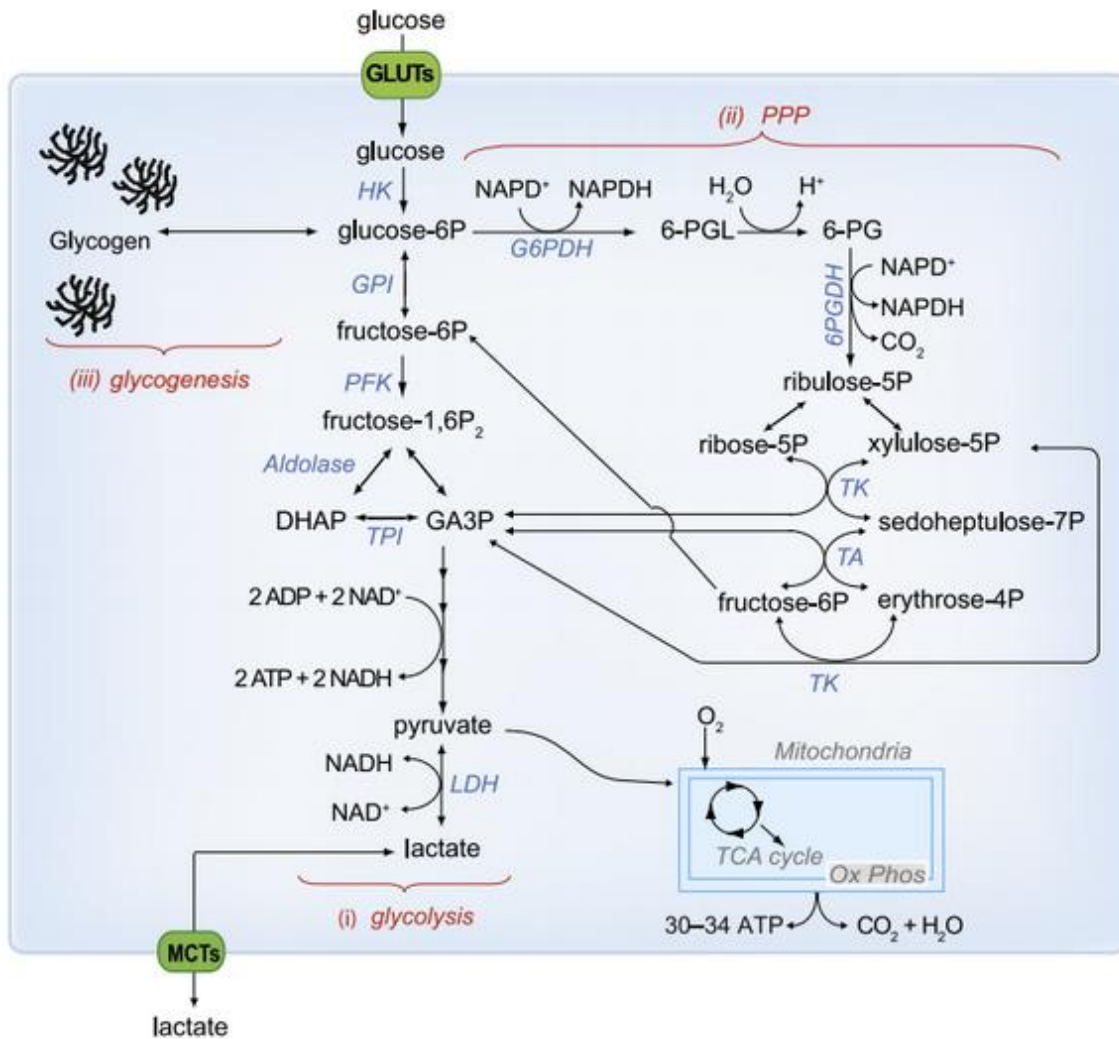


Figura 4. Vías metabólicas de la glucosa en los astrocitos.

Por otra parte, se ha observado que la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 (Pfkfb3) es casi inexistente en las neuronas debido a su constante degradación, en contraste con lo observado en los astrocitos, donde los niveles de expresión son mucho más altos. Esta enzima es la encargada de la generación de

fructosa-2,6-bisfosfato, un potente activador de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa-1. Por todo ello, las neuronas tienen un ratio metabólico mucho menor que los astrocitos. Además, la activación de la glucólisis neuronal vía Pfkfb3 supone un aumento del estrés celular y la apoptosis neuronal. En las neuronas, el metabolismo de la glucosa está ligado principalmente a la vía de las pentosa fosfato, esencial para la producción de NADPH y el mantenimiento del potencial antioxidante celular, lo que conduce a la regeneración de glutatión reducido (Belanger y cols., 2011; Bolaños y cols., 2010).

Las neuronas, en momentos de mayor actividad o de hipoglucemia, utilizan el lactato como una fuente eficiente de energía (Dienel y Hertz 2001; Forsyth y cols., 1996; Forsyth 1996) incluso prefiriendo este sustrato por encima de la glucosa cuando ambos están presentes (Belanger y cols., 2011); por ello se ha propuesto el modelo de funcionamiento "lanzadera lactato-astrocito-neurona" (Magistretti y Pellerin 1999; Pellerin y cols., 2007). Esta función de los astrocitos es básica para supervivencia neuronal, ya que el consumo energético del cerebro, un 2% del peso corporal, es del 25% de la glucosa y el 20% de oxígeno que se aporta a todo el organismo (Magistretti y Pellerin 1999).

Este tráfico está regulado por la liberación de glutamato y la posterior actividad sináptica que implica la activación de los receptores AMPA y NMDA (Chih y cols., 2001; Rouach y cols., 2008). Esta activación dependiente de glutamato aumenta el gradiente de Na^+ en los astrocitos, lo que desencadena una cascada de reacciones moleculares que conducen a la activación de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y de la glucólisis (Forsyth y cols., 1996; Magistretti y Pellerin 1999).

Los astrocitos son las células responsables del mantenimiento del equilibrio de iones, pH, etc., es decir la homeostasis del medio intersticial, donde se va a producir la transmisión sináptica (Belanger y Magistretti 2009). Los astrocitos son ricos en canales para el transporte de agua (acuaporina 4), y en transportadores encargados de la recaptación del K^+ extracelular que se libera en los potenciales de acción. Asimismo, en la membrana plasmática de los astrocitos hay diferentes intercambiadores y bombas de protones como el Na^+/H^+ , transportadores de ácido monocarboxílico y bicarbonato, y el intercambiador de protones ATPasa, de tipo vacuolar (Sofroniew y Vinters 2010).

Antecedentes bibliográficos

Los astrocitos son células no excitables, en términos de electrofisiología, pero pueden generar olas de Ca^{2+} que se propagan de forma sincronizada; estas olas dependen de la actividad que tengan las neuronas y los astrocitos. Los astrocitos, en respuesta a las propagaciones de Ca^{2+} , liberan sustancias difusibles, que se denominan gliotransmisores y que intervienen y regulan la sinapsis neuronal (Koizumi 2010). Por lo tanto, la función sináptica no es exclusivamente el resultado de la señalización entre neuronas, sino que también incluye la señalización bidireccional entre las neuronas y astrocitos (Perea y Araque 2010). En vista de estos nuevos descubrimientos, en los que se demuestra la comunicación entre neuronas y astrocitos y la capacidad moduladora que éstos tienen en la sinapsis, los astrocitos deben considerarse como una parte integral de la sinapsis, derivando de aquí el término de “sinapsis tripartita” (Perea y cols., 2009).

Los astrocitos son capaces de responder ante la actividad neuronal y los neurotransmisores liberados por éstas a través de la activación de los receptores localizados en su membrana y, a su vez, los astrocitos pueden liberar, mediante exocitosis vesicular, neurotransmisores como el ATP, la D-serina, y el glutamato, que actuarán sobre las neuronas y los propios astrocitos (Halassa y Haydon 2010). El glutamato liberado por las neuronas activa sus receptores en la membrana de los astrocitos, y puede conducir a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esto produce una liberación de glutamato por parte de los astrocitos, que activa los receptores NMDA extrasinápticos y aumenta la excitabilidad de las neuronas (Hamilton y Attwell 2010).

Los astrocitos tienen otra función importante, como la de eliminar el glutamato del espacio extracelular. Esta función se lleva a cabo mediante los transportadores de aminoácidos, acoplados con el transporte de Na^+ y K^+ (que se desplazan dependiendo de sus respectivos gradientes de concentración), lo que permite la recaptación del glutamato al interior de la célula. La retirada del glutamato del espacio extracelular por parte de los astrocitos, permite que cese la transmisión sináptica y previene lo que se ha denominado excitotoxicidad, situación en la cual las neuronas son dañadas y destruidas por la sobreactivación de receptores de este neurotransmisor excitatorio, que es el glutamato. Los astrocitos expresan dos tipos de transportadores de glutamato, asociados principalmente a zonas de sinapsis: el transportador de L-glutamato/L-

aspartato (GLAST-1), y el transportador glial de L-glutamato (GLT-1); también se denomina a este grupo de transportadores como “transportadores de aminoácidos excitatorios”, siendo sus siglas respectivamente EAAT1 y EAAT2. Una vez en el citoplasma, la glutamina sintetasa cataliza el paso de glutamato a glutamina (Malarkey y Parpura 2008).

Los astrocitos también desempeñan importantes funciones durante el desarrollo del sistema nervioso, sirviendo de guía (glía radial de origen astroglial) para la migración de neuronas hasta su emplazamiento correspondiente y para la maduración neuronal, participando en el direccionamiento del cono axónico hacia la formación de contactos sinápticos (Faissner y cols., 2010).

Es un hecho interesante que las neuronas son capaces de controlar la diferenciación de la glía. De la misma forma, el comportamiento de las neuronas también depende del tipo de célula glial con la que se asocian para establecer su migración. Los astrocitos, al igual que el resto de células gliales, se encuentran expuestos a la acción de diversas sustancias, como las interleucinas, neurotrofinas, etc. (Dodla y cols., 2010). Estas sustancias condicionan su desarrollo, funcionamiento y respuesta ante una posible lesión del sistema nervioso. Los astrocitos a su vez pueden ser fuente de muchas de estas sustancias, mediante las que se establecen relaciones tróficas con las neuronas (Cirulli y Yebra 2007; Powell y cols., 1997).

En el SNC de los mamíferos adultos, en zonas muy limitadas, hay células madre que generan continuamente nuevas neuronas. La glía, y en particular los astrocitos, tienen un papel clave en el control de los pasos en la neurogénesis adulta, desde la proliferación hasta la migración y el destino de las neuronas, y en su posterior integración en los circuitos neuronales ya existentes en el cerebro (Kolar y Machackova 2005).

Otra función más de este tipo celular es la de reparación en caso de lesiones en el sistema nervioso, pudiendo desempeñar una labor de limpieza y reparación, junto con las células microgliales, y donde los astrocitos sufren una serie de transformaciones, tanto morfológicas como funcionales, denominándose entonces astrocitos reactivos. Estos astrocitos presentan un núcleo indentado y el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi muy desarrollados; presentan además cuerpos densos (lisosomas). También se

observan cambios en el citoesqueleto, expresando gran cantidad de gliofilamentos de vimentina y adquiriendo capacidad proliferativa. Estos astrocitos reactivos forman una “cicatriz glial” alrededor de la zona lesionada, aislándola del resto del tejido nervioso (Sofroniew 2009).

2.3 Señalización neuroglial

El glutamato es el neurotransmisor excitador más importante en el SNC. Como se ha mencionado anteriormente en esta introducción, es el principal mediador de fenómenos como la potenciación a largo plazo o la plasticidad sináptica. Los astrocitos poseen receptores para este neurotransmisor y, al mismo tiempo, también son capaces de secretarlo. Una de las formas mediante las que los astrocitos podrían liberar glutamato es la exocitosis; este hecho tiene grandes implicaciones en la intercomunicación astrocito-neurona (Araque y cols., 2001).

La secreción del neurotransmisor glutamato por parte de los astrocitos, puede modular la actividad de neuronas vecinas, y de sus sinapsis, representando la base de la “sinapsis tripartita”; en esta interrelación celular, el glutamato secretado por los astrocitos tiene efectos inmediatos, al actuar sobre receptores extrasinápticos ionotrópicos tipo NMDA (receptores cuyo agonista es el n-metil-D-aspartato) de la neurona postsináptica, dando lugar a corrientes lentas de entrada en la neurona sobre la que actúan, o bien sobre receptores de glutamato de tipo metabotrópico presinápticos, dando lugar a una modulación sináptica a más largo plazo (fenómenos de potenciación o depresión a largo plazo, que en definitiva van a modular el grado de actividad de una determinada sinapsis) (Halassa y cols., 2007; Perea y Araque 2005; Pirttimaki y cols., 2011).

También se ha propuesto que el ATP y la D-serina pueden tener implicaciones en estos mecanismos (Haydon y Carmignoto 2006). Teniendo en cuenta este hecho, y dado que los astrocitos intervienen en la modulación de los circuitos neuronales del hipocampo, junto con la proporción existente entre el número de neuronas y de células gliales, y estando representada la mayor parte de la población celular por los astrocitos,

se refuerzan las implicaciones de estas células en los mecanismos de aprendizaje y asociación que se dan en el hipocampo (Magistretti 2011).

2.3.1 Receptores de glutamato presentes en los astrocitos

Existen dos grupos de receptores de glutamato, ionotropos y metabotropos. Basándose en las propiedades farmacológicas y biofísicas, los receptores ionotropos se subdividen en tres familias:

-AMPA: este receptor consta de cuatro subunidades, GluR1-GluR4. Denominados así por el agonista que los activa (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato, AMPA), se trata de receptores acoplados a un canal iónico que conduce Na^+ y K^+ y por tanto al unirse el glutamato a este receptor se produce la apertura del canal iónico conduciendo a la despolarización de la célula y a la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Seifert y Steinhauser 2001; Shelton y McCarthy 1999).

-Kainato: este receptor está compuesto por las subunidades GluR₅, GluR₆, GluR₇, KA₁ y KA₂. Su mecanismo de acción es igual que el del receptor AMPA (Seifert y Steinhauser 2001; Shelton y McCarthy 1999). El kainato, ácido (2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil)-acético monohidrato, es una molécula producida por el alga marina *Digenea simplex* y fue aislada por primera vez en 1953. Además del glutamato y el kainato, existen más de cien sustancias agonistas de estos receptores, como pueden ser el ácido domoico y derivados, el ácido acromélico y análogos o el ácido quisquálico (Bunch y Krosggaard-Larsen 2009).

-NMDA: compuesto por las subunidades NR₁, NR_{2A}-NR_{2D} y NRL. Denominados así por ser el N-metil-D-aspartato un agonista de estos, son receptores acoplados a un canal iónico capaz de permitir el paso de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . En condiciones normales este canal se encuentra bloqueado por Mg^{2+} , de manera que se requiere una despolarización previa para que este ion deje libre el canal y puedan ser conducidos a su través los iones anteriores, dando lugar a una despolarización de la célula, aparte de una entrada de iones Ca^{2+} que actúan como segundo mensajero. La despolarización inicial se logra gracias a la acción del glutamato sobre el receptor AMPA y/o Kainato (Seifert y

Steinhauser 2001; Shelton y McCarthy 1999). En astrocitos, estos receptores tienen ciertas diferencias, en comparación con las neuronas, ya que el poro no está bloqueado por Mg^{2+} pudiendo ser activos a potenciales de membrana de reposo (Lalo y cols., 2006) y la composición de las subunidades que lo forman es distinta (Palygin y cols., 2011).

Los receptores metabotropos forman una familia heterogénea de receptores que están vinculados a varias vías de señales de transducción a través de proteínas G. A diferencia de los receptores ionotropos, la unión de glutamato a los receptores metabotropos no activa la apertura de un canal intrínseco, sino que regula la activación o inhibición de varios sistemas efectores acoplados a proteínas G. Por esta razón, los efectos de la activación de esta clase de receptores son considerablemente más lentos al inicio, pero la duración de su acción es mayor, por lo cual pueden modular la actividad neuronal a través de un mayor período de tiempo (Simeone y cols., 2004). La estructura de estos receptores está muy conservada siendo la típica estructura de los receptores acoplados a proteínas G, que consta de siete dominios transmembrana.

Se denominan con las siglas mGluR, y hasta la fecha se han descrito 8 subtipos, divididos en tres grupos. El grupo I (mGluR₁ y mGluR₅), lleva a la activación de la PLC, resultando en la generación de dos segundos mensajeros: el DAG, y el IP₃. Se encuentran principalmente en posición postsináptica. Este mecanismo lleva a la excitación neuronal y, a su vez, esto produce un feedback positivo que puede llevar a sobreexcitación causando posible muerte celular. En contraste, la activación de los grupos II (mGluR₂ y mGluR₃) y III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ y mGluR₈), inhibe a la AC, y como resultado no se produce AMPc, lo que provoca una menor liberación de glutamato; tiene una acción neuroprotectora, y se encuentran en su mayoría en posición presináptica (Hansson y Ronnback 2004). Los astrocitos expresan los receptores mGluR₅ y mGluR₃, pero no los demás tipos; esta determinación se ha realizado con técnicas que revelan la presencia del ARNm, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Condorelli y cols., 1997; Schools y Kimelberg 1999). En el hipocampo podemos encontrar todos los tipos de receptores metabotropos de glutamato, excepto el mGluR₆, para el que no se ha detectado ARNm, ni tampoco se han obtenido resultados positivos en técnicas de inmunorreacción (Shigemoto y cols., 1997). En la figura 5 se describen de

manera esquemática los canales, receptores y transportadores que se han descrito anteriormente y que regulan e intervienen en la señalización de glutamato.

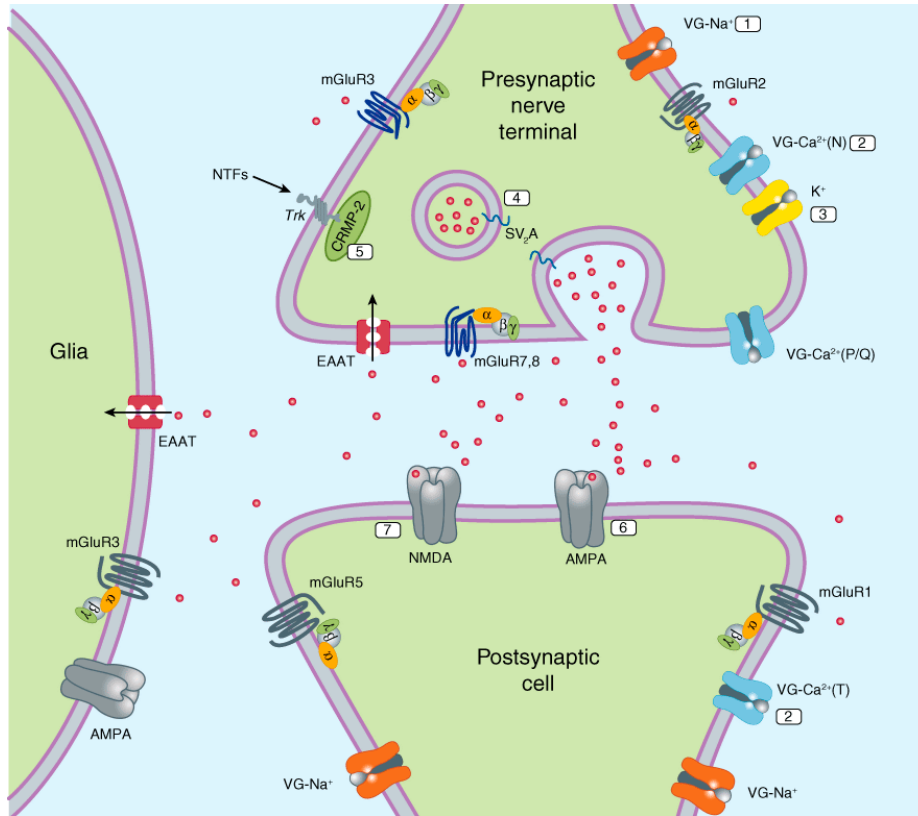


Figura 5. Descripción esquemática de los canales, receptores y transportadores que operan en la regulación y señalización de glutamato

Además de los receptores para el glutamato, los astrocitos participan en la señalización mediada por otros neurotransmisores. Este subtipo glial expresa receptores de ATP, tanto para adenosina como para nucleótidos de adenina, que se denominan receptores de purina o purinérgicos de tipo 1 y de tipo 2, respectivamente. También están implicados de manera directa en la señalización receptores adrenérgicos de epinefrina y norepinefrina. El ácido gamma-aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC y los astrocitos expresan receptores para este neurotransmisor, para el que se han definido tres tipos: GABA_A, GABA_B y GABA_C. Los astrocitos también presentan receptores para otros neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas, entre los que cabe destacar acetilcolina, serotonina o histamina (Hansson y Ronnback 2004; Verkhratsky y cols., 1998).

2.4 Páncreas

El páncreas es una glándula túbuloacinar compuesta que está situada en la región craneal de la cavidad abdominal. En general, se localiza detrás del estómago y se extiende desde el bazo hasta las asas duodenales. El tejido pancreático está recubierto por una fina capa de tejido conectivo laxo del cual parten septos hacia el interior de la glándula dividiéndola en pequeños lóbulos.

El aporte sanguíneo del páncreas viene dado por las arterias celíaca y mesentérica craneal; de éstas parten ramas que se subdividirán en pequeños vasos que irrigan al tejido pancreático. El drenaje venoso está a cargo de pequeñas venas, satélites al sistema arterial y que desembocan en la vena porta y en la vena esplénica (Llc 2010).

El conducto por el que se vierten al duodeno los productos de secreción elaborados por las células pancreáticas en la rata, el conducto pancreático-biliar común, se extiende a lo largo de la glándula, desembocando en él los conductos interlobulares que proceden de unas unidades funcionales, que reciben el nombre de lóbulos pancreáticos. Estos conductos interlobulares son el resultado de la unión de unidades más pequeñas que son los conductos intralobulares y que reciben el contenido que los acinos pancreáticos han vertido a los conductos intercalares; éstos últimos se comunican directamente con la luz del acino pancreático. Así, el árbol que forman los conductos pancreáticos y que sólo representan un 2% del volumen total del páncreas de la rata (Githens 1988), desempeña un papel de soporte estructural del tejido pancreático, además de su función de conducción de las secreciones enzimática y fluida al duodeno (figura 6).

El páncreas es una glándula mixta o anfícina, constituida por una porción endocrina y una exocrina, la cual representa la mayor parte del tejido (84%). Los conductos pancreáticos y vasos sanguíneos representan el 4% del volumen total del páncreas, mientras que la porción endocrina constituye tan sólo el 2% aproximadamente. El resto, un 10%, lo constituye la matriz extracelular (Barrett y cols., 2006). Las funciones exocrina y endocrina las llevan a cabo diferentes grupos de células. Las enzimas digestivas y el jugo pancreático son elaborados en las células acinares y ductulares respectivamente y llegan al duodeno a través del conducto pancreático,

donde participarán en las etapas finales de la hidrólisis de proteínas, grasas y carbohidratos (Go 1986).

Las células acinares están comunicadas entre sí por medio de las uniones intercelulares o “gap junctions”, lo que permite que las señales que se han originado en una célula se propaguen al resto de la población celular. La ventaja de este fenómeno es la posibilidad de que se generen respuestas secretoras mayores que si solamente se estimulase un número limitado de células acinares (Meda 1996).

Los conductos pancreáticos, además de constituir el sistema de conducción de las enzimas digestivas, participan en la elaboración del jugo pancreático, contribuyendo con el componente fluido y electrolitos a la formación del mismo (Barrett y cols., 2006).

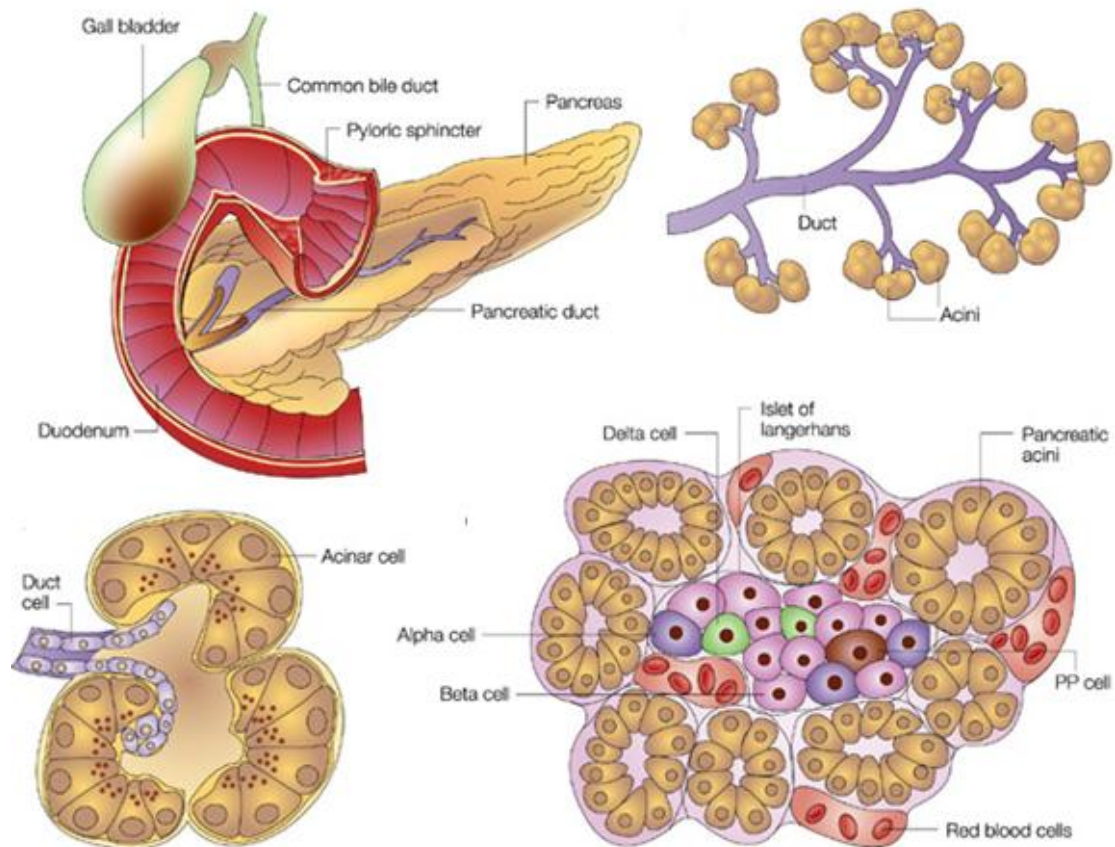


Figura 6. Anatomía pancreática

La porción endocrina del páncreas está constituida por los islotes de Langerhans y se encarga de la fabricación de hormonas que van a participar en el metabolismo de

los glúcidos. Estos islotes son grupos de células que están distribuidos por todo el tejido pancreático y rodeados por las células exocrinas y los productos por ellos elaborados entran en la circulación sanguínea (Go 1986).

2.5 El acino pancreático

Se considera que la subunidad básica y funcional del páncreas exocrino es el acino pancreático, una agrupación de células secretoras dispuestas alrededor de un espacio o luz acinar, rodeadas de una matriz de tejido conectivo. Este tejido conectivo se continúa con aquel que rodea el epitelio de los conductos.

La mayoría de las células en el acino lo constituyen las células acinares, existiendo un número reducido de las denominadas células centroacinares que marcan el comienzo del sistema de conducción de la glándula. Al microscopio, las células acinares presentan una forma piramidal con el vértice dirigido hacia la luz del acino (figura 7).

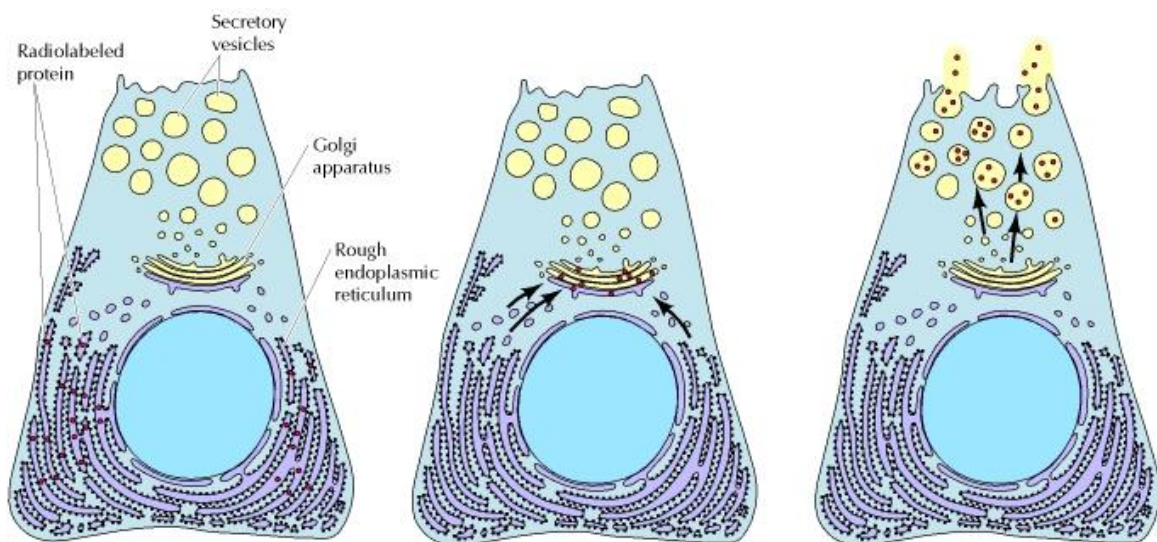


Figura 7. Morfología de una célula acinar pancreática en reposo y durante el proceso de secreción enzimática

Dentro de la célula acinar existe un cierto grado de especialización. Los gránulos de zimógeno se localizan en el polo apical del citoplasma y su número varía en función del grado de desarrollo y del grado de estimulación por los agentes neurohormonales. En el espacio existente entre el polo apical y el núcleo de la célula (situado en el polo basal) se distribuye el complejo de Golgi, que tiene un aspecto pálido cuando se observa al microscopio óptico (Doyle y Jamieson 1978) (figura 8).



Figura 8. Imagen tomada en un microscopio electrónico de barrido. El núcleo aparece coloreado en azul y los gránulos de zimógeno en amarillo.

Finalmente, existe una tercera área en la célula acinar, que se caracteriza por ser intensamente basófila, que está localizada en la región basal de la célula y que está ocupada por el retículo endoplasmático rugoso y el núcleo. En el citoplasma también encontramos mitocondrias, que en ocasiones están inmovilizadas entre los elementos que forman el retículo, o las podemos encontrar dispuestas a bajo la membrana celular. También se pueden encontrar mitocondrias entre los gránulos de zimógeno (Gonzalez y cols., 2000) y formando un “cinturón” que limita la zona apical (Tinel y cols., 1999) (figura 9). Algunas de las vacuolas del complejo de Golgi contienen un material de densidad intermedia, mientras que existen otras con un contenido similar al de los gránulos de zimógeno; estos elementos se denominan vacuolas de condensación, que están en estadios de transición dentro del proceso de formación de los gránulos de zimógeno (Doyle y Jamieson 1978).

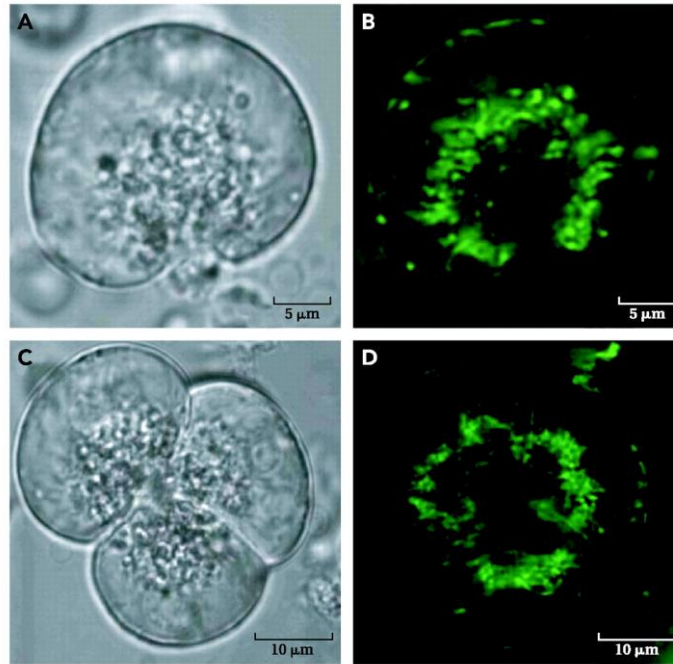


Figura 9. Imagen de microscopía confocal en la que se observa la distribución intracelular de las mitocondrias, rodeando los gránulos de zimógeno en la zona apical de las células acinares pancreáticas.

2.6 Control de la secreción pancreática exocrina

La secreción pancreática exocrina está controlada por medio de factores nerviosos y humorales, que van a coordinar la actividad secretora del páncreas. Estos factores, que se han denominado *primeros mensajeros*, actúan sobre sus receptores localizados en la membrana de las células pancreáticas, activándolas y generando señales intracelulares. Estas señales conducen a toda una cadena de acontecimientos que se denomina *acoplamiento estímulo-secreción* que, en última instancia, desencadena una respuesta celular (Petersen 1992). Los primeros mensajeros interactúan entre sí pudiendo tener funciones tanto estimuladoras como inhibitoras de la secreción pancreática exocrina.

2.6.1 Control nervioso

La inervación del páncreas tiene dos implicaciones importantes en la fisiología de la glándula. La primera es la regulación de la secreción pancreática, y la segunda tiene relación con la patogénesis del dolor, característica en los procesos de inflamación y carcinogénesis. Estas aferencias constituyen fibras procedentes del nervio vago y de los nervios esplácnicos, y son fibras parasimpáticas fundamentalmente. Numerosos estudios *in vivo* han revelado la importancia de la actuación de agentes colinérgicos sobre la secreción pancreática exocrina. El nervio vago es el principal elemento colinérgico que actúa sobre esta glándula, siendo la acetilcolina (ACh) el neurotransmisor más destacado (Barrett y cols., 2006).

La función del neurotransmisor ACh se manifiesta en el acino pancreático a través de la activación de receptores muscarínicos localizados en la membrana celular (Chey y Chang 2001). La ACh es un neurotransmisor que ocasiona una gran cantidad de efectos ampliamente descritos en el páncreas exocrino, entre los que se encuentran: estimulación de la secreción de enzimas digestivas, incremento de la secreción de jugo pancreático rico en ion cloruro y activación de la síntesis de enzimas pancreáticos (Chanson y cols., 1999).

2.6.2 Control humoral

Se ha considerado a la secretina y a la colecistocinina (CCK) como las principales hormonas que regulan las respuestas del páncreas exocrino a la comida. La llegada del contenido ácido gástrico (quimo) al duodeno conduce a la liberación de estas hormonas por parte de células especializadas del sistema APUD (Amine Precursor Uptake Descarboxilase), un conjunto de células neurosecretoras que se localizan en la mucosa duodenal (Go 1986). En el caso de la secretina, se admite de forma generalizada que sus efectos fundamentalmente se presentan sobre las células ductulares, y en menor medida sobre las células acinares pancreáticas, conduciendo al incremento las concentraciones citoplasmáticas de adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) (Ulrich y

cols., 1998). Esta hormona actúa estimulando la secreción de agua y electrolitos, por lo que regula el componente hidromineral del jugo pancreático.

La CCK es un péptido originariamente aislado y purificado en intestino delgado de cerdo. Sus efectos sobre el páncreas exocrino se resumen en provocar fundamentalmente un incremento en la secreción de enzimas, presentando algunas diferencias interespecíficas en cuanto a su capacidad de estimular la secreción de hidromineral (Chandra y Liddle 2013; Niederau y cols., 1994). Además, presenta otras acciones entre las que se encuentran promover alteraciones en la síntesis de proteínas (Perkins y cols., 1991), efectos tróficos (Gaslander y cols., 1990) y, a concentraciones elevadas, puede estimular la adenilatociclasa (AC) pancreática, elevando la concentración de AMPc (Chandra y Liddle 2011; Gardner y cols., 1983).

La CCK actúa en las células acinares pancreáticas activando la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂) de membrana, conduciendo a la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que va a movilizar el calcio (Ca²⁺) intracelular (Berridge y Irvine 1989) (figura 10).

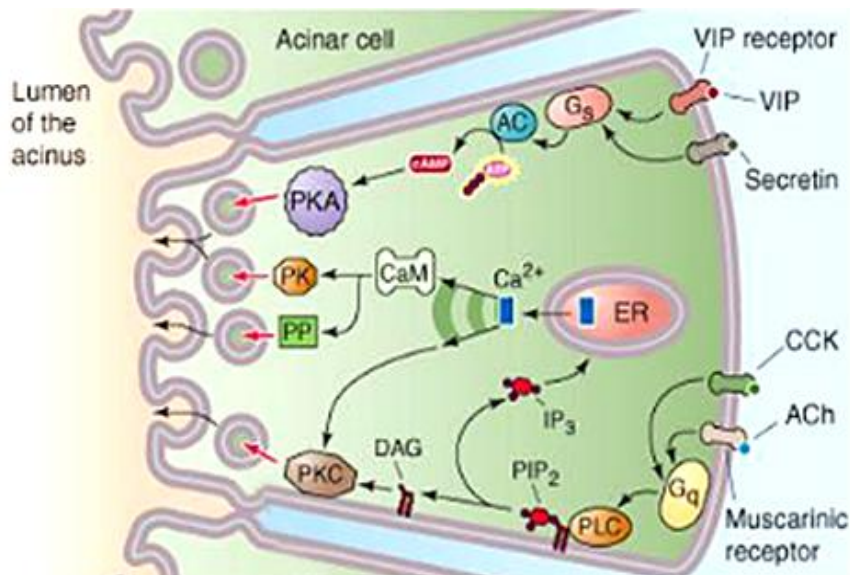


Figura 10. Descripción esquemática de las vías de señalización activadas tras la unión de CCK a sus receptores en la membrana plasmática. Además de las vías de señalización activadas por clásicamente por receptores acoplados a proteínas G como la (PLC o AC).

2.6.3 Receptores y señalización transmembrana

Los receptores de los principales secretagogos pancreáticos son proteínas de membrana acopladas a proteínas G con siete dominios transmembrana. Desde un punto de vista funcional, los más importantes son los receptores de la CCK y la ACh. En cuanto a la CCK, se han descrito dos tipos de receptores presentes en la membrana de las células acinares: CCK1 y CCK2 (Dufresne y cols., 2006), siendo el primero específico para CCK y el segundo capaz de unir tanto CCK como gastrina. En cuanto al receptor muscarínico para la ACh, el subtipo presente en células humanas y de ratón es el M3 (Ji y cols., 2001). Se ha comprobado que la ocupación de los receptores muscarínicos en células acinares pancreáticas produce la activación de la fosfolipasa C (PLC), que va seguida de un incremento en la hidrólisis de PIP_2 con la consiguiente generación de IP_3 y el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que produce un incremento de la secreción de enzimas digestivas (Niebergall-Roth y Singer 2003). En la secreción pancreática también está implicado un aumento de GMPc . Esta ruta de señalización está mediada por el NO ya que el bloqueo de la producción de NO por inhibidores de la NO sintasa, reducen la generación de GMPc inducida por carbacol o CCK de manera dosis dependiente (Gukovskaya y Pandol 1994; Yoshida y cols., 1997). El NO también podría ser liberado en terminaciones nerviosas localizadas en la glándula, controlando a este nivel la liberación de neurotransmisores que, a su vez, podrían regular la secreción pancreática (Yago y cols., 2001). Por otra parte, un aumento en la concentración de NO podría estimular a la PLC, con la consiguiente generación de IP_3 y la movilización de Ca^{2+} intracelular (Moustafa y cols., 2011).

La estimulación de las células acinares pancreáticas con CCK, ACh o bombesina a concentraciones suprafisiológicas provoca señales de Ca^{2+} similares, que implican un incremento de en torno a 5-12 veces la concentración basal de Ca^{2+} . La respuesta observada en estas células se compone de un pico rápido inicial, que es consecuencia de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, seguido de una fase en la que la señal de Ca^{2+} se mantiene en un valor más o menos constante (de *plateau*) mientras el agonista esté presente. La fase de *plateau* se debe a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Tsunoda y cols., 1990).

El patrón de respuesta a concentraciones fisiológicas de CCK (1-50 pM) o ACh (50-300 nM) difiere mucho del descrito anteriormente. En estas condiciones, la respuesta consiste en incrementos transitorios, de corta duración, que se repiten en el tiempo, y que se han denominado oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} , presentando patrones distintos para el estímulo con CCK o ACh (LeBeau y cols., 1999). Este comportamiento es debido a la dinámica de liberación y recaptación de Ca^{2+} desde los depósitos, habiéndose propuesto diferentes mecanismos responsables de este patrón de movilización. La entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular es necesaria para el mantenimiento del patrón oscilatorio (Petersen 2009).

Las células acinares pancreáticas están ampliamente comunicadas entre sí mediante uniones hendidas o "gap junctions". Teniendo en cuenta esta organización, se ha propuesto que las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$; inducidas por CCK podrían estar iniciadas por una sola célula marcapasos, con mayor sensibilidad que el resto para la CCK (Kanno 1998).

2.6.4 Exocitosis de las enzimas digestivas

El proceso de acoplamiento estímulo-secreción finaliza con la exocitosis de los gránulos de zimógeno. En este proceso, posterior a la señal de Ca^{2+} , se requiere el transporte de los gránulos de zimógeno hacia la membrana apical y su interacción con una serie de proteínas de esta zona de la membrana celular, cuyo fin último, es provocar la fusión y liberación del contenido de los gránulos.

Para ello es necesaria la participación del citoesqueleto y de proteínas de las familias SNARE y proteínas G de pequeño peso molecular y chaperonas. El citoesqueleto contribuye mediante el mantenimiento de la morfología y la compartimentalización celular, a la vez que dirige los gránulos hacia el polo apical de la célula (McNiven y Marlowe 1999).

Las proteínas G de pequeño peso molecular tienen un papel destacado en el proceso de secreción. Un primer grupo son las proteínas de la familia Rho, cuya función

principal es la remodelación del citoesqueleto de actina. Esta proteína se activa por secretagogos (Sabbatini y cols., 2010).

Otras proteínas pertenecientes a esta familia implicadas en la secreción de enzimas digestivas son las proteínas Rab y Rap (Williams 2010). Diversas proteínas Rabs como como Rab3D, Rab27B y Rap1 han sido identificadas en los gránulos de zimógeno y su función parece ser la de aproximar al gránulo de zimógeno hacia la membrana. Estas proteínas posibilitan el contacto inicial entre la membrana de los gránulos de secreción y la membrana celular. Seguidamente, la fusión de ambas membranas se lleva a cabo gracias al complejo de proteínas SNARE, que anclan las membranas y facilitan la energía necesaria en el proceso (Jahn y Scheller 2006).

Una vía alternativa para la secreción es la participación de vesículas lisosomales, mediante la translocación de un marcador lisosomal a la membrana plasmática activado por la proteína CRHSP-28 (Thomas y cols., 2004).

2.7 Descripción de la línea celular tumoral pancreática AR42J

La línea celular tumoral pancreática AR42J deriva de nódulos hiperplásicos malignos inducidos por azaserina (Longnecker y cols., 1979). Esta línea celular de acinos pancreáticos de rata es estable y ha sido y es ampliamente utilizada como sistema para investigar la fisiología de las células acinares pancreáticas, incluyendo el estudio de su proceso de diferenciación celular, su capacidad secretora y su crecimiento. Sin embargo, durante su proceso de inmortalización y transformación maligna, esta línea celular manifiesta un fuerte potencial anficrino.

Las células AR42J (figura 11) difieren de las células acinares en al menos tres características:

- Proliferan rápidamente.
- Sintetizan, almacenan y secretan enzimas digestivas, pero la regulación de su función exocrina es anormal, desde la aparición de receptores atípicos hasta un

Antecedentes bibliográficos

metabolismo inusual del inositol fosfato (IP) y una desorganización del citoesqueleto.

- Poseen un patrón añadido regulado neuroendocrinamente, caracterizado por corrientes iónicas sensibles al voltaje y la liberación de pequeños neurotransmisores (GABA, glicina, ácido glutámico) (Christophe 1994).

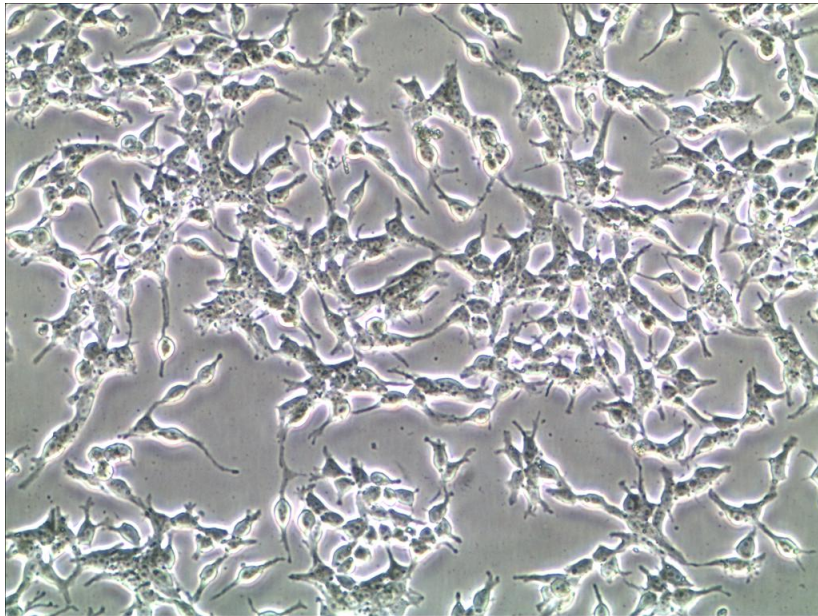


Figura 11. Células AR42J en cultivo.

La dexametasona convierte las células pluripotentes AR42J en células exocrinas que fabrican enzimas digestivas. Los cambios fenotípicos inducidos por dexametasona en células AR42J incluyen incrementos en los orgánulos secretores con una reorganización del retículo endoplasmático rugoso (paso de estructura tubulovesicular a una configuración de sus cisternas biosintéticamente eficiente), un aumento en cinco veces el número de gránulos secretores (Logsdon y cols., 1985; Logsdon y cols., 1987; Rajasekaran y cols., 1993), expresión de genes específicos (Estival y cols., 1991), y aparición de receptores para CCK (Rosewicz y cols., 1992). Además, los glucocorticoides inhiben el crecimiento de las células AR42J en torno a un 75% después de cuatro días de tratamiento con dexametasona (Guthrie y cols., 1991), al igual que se observa en otras células animales, lo que es considerado como otro marcador de diferenciación celular.

Este conocimiento previo indica que las células AR42J pueden ser útiles para estudios a largo plazo de las funciones de células acinares pancreáticas.

2.8 Mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta

Las señales que se generan y se transmiten en las células en respuesta a determinados estímulos se inician con la activación de receptores específicos de membrana por la unión de los agonistas. La cadena de acontecimientos que tiene lugar en una célula tras la unión de un mensajero extracelular a su receptor de membrana se conoce con el nombre de *acoplamiento estímulo-respuesta*. La unión de los agonistas a sus respectivos receptores produce en ellos un cambio conformacional que conlleva la apertura o cierre de un canal en la misma proteína o a la activación de diversas enzimas intracelulares, generando *segundos mensajeros*. Estos segundos mensajeros se unen a sus receptores intracelulares específicos modificando la $[Ca^{2+}]_i$, la de AMPc, el estado de fosforilación de proteínas, la apertura o cierre de canales, etc.

2.8.1 Proteínas G

Las proteínas G, denominadas también “GTP binding proteins”, ψ están compuestas por un trímero de subunidades α , β y γ . Las proteínas G se clasifican en estimuladoras (Gs) e inhibidoras (Gi), y regulan la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC). Un ejemplo de receptor cuya activación está acoplada a una proteína G inhibidora de la AC es el receptor metabotrofo de glutamato mGluR2, y también mGluR3. La familia Gs es también responsable del acoplamiento de otros receptores como los del de VIP y la somatostatina.

Otras proteínas G activan a la fosfolipasa C (PLC), y se denominan Gq. En este grupo se incluyen los receptores mGluR1 y mGluR5, y los receptores de CCK, ACh y bombesina. Además, se han descrito otras isoformas en las células receptoras olfatorias y fotorreceptoras (Golf y Gt, respectivamente), y en las neuronas (Go) (Pin y cols., 1999; Simon y cols., 1991).

El mecanismo de acción de las proteínas G se pone en marcha cuando un ligando se une a su receptor en la membrana celular. La subunidad α , que hasta el momento permanecía unida al difosfato de guanosina (GDP), se disocia y se intercambia por trifosfato de guanosina (GTP). Dicho cambio provoca la separación del complejo formado por las subunidades β y γ de la subunidad. Ésta última se une al efector (PLC o AC) y lo activa (figura 12). Posteriormente se hidroliza el GTP a GDP, lo que causa la disociación de la subunidad α . En este punto la subunidad α pasa de nuevo a ser inactiva, y se une a las otras dos subunidades. Este paso produce una amplificación de la señal, debido a que la duración de la unión entre el complejo GTP-proteína G es de mayor duración que la unión entre el ligando y su receptor. Recientemente se ha descrito que el complejo β/γ ; también participa en la función de las proteínas G (Simon y cols., 1991).

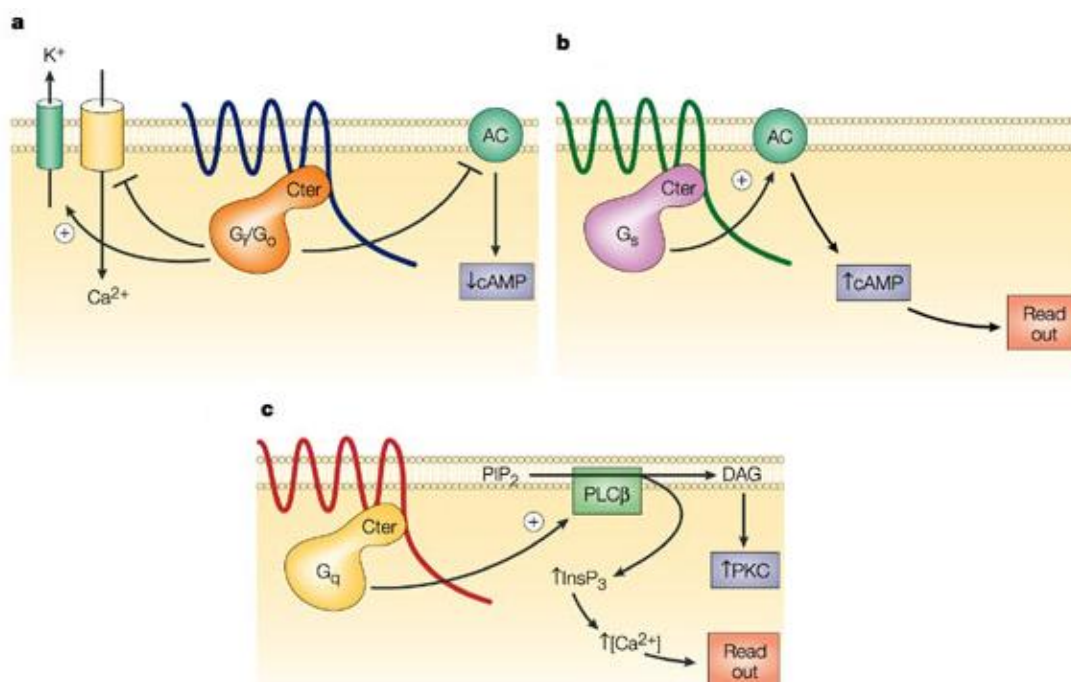


Figura 12. Receptores acoplados a proteínas G. A) Receptor de membrana acoplado a proteína G inhibidora de la AC. B) Receptor de membrana acoplado a proteína G activadora de la AC. C) Receptor de membrana acoplado a proteína G activadores de PLC.

2.8.2 Adenilato ciclasa y AMPc

La adenilato ciclasa (AC) es una familia de enzimas que convierten el ATP en AMPc, donde el C-3' de la ribosa se une al grupo fosfato situado en posición α , liberando pirofosfato (Ppi), que a su vez es hidrolizado por la pirofosfatasa en 2 moléculas de fosfato inorgánico (Pi). La energía liberada en esta última hidrólisis va a ser usada para la ciclación del ATP; cabe destacar que es un mecanismo que se ha encontrado en todos los tejidos de los mamíferos (Krupinski 1991).

El AMPc es un segundo mensajero intracelular, que activa la proteína cinasa A (PKA) por un lado, aunque se ha encontrado que, por otro, inhibe la activación de la PLC, la proteína cinasa C (PKC) y de proteínas cinasas con actividad mitogénica (Walsh y Van Patten 1994).

Junto con el Ca^{2+} , el AMPc juega un papel central en la regulación de la secreción pancreática. El VIP y la secretina son los principales agonistas fisiológicos que estimulan la producción de AMPc, activando la AC (Rutten y cols., 1972).

En astrocitos, las citoquinas proinflamatorias como IL-1 o $\text{TNF}\alpha$, la estimulación de receptores α y β adrenérgicos, y de los receptores de serotonina, histamina o VIP incrementan la actividad de la AC, y por tanto, los niveles intracelulares de AMPc (Huneycutt y Benveniste 1995).

2.8.3 Guanilato ciclasa y GMPc

Las guanilato ciclasas (GC) son una familia de enzimas que catalizan la formación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir de GTP. Pueden ser de dos tipos: GC de membrana ó GC citosólica.

El GMPc es un segundo mensajero intracelular que regula la actividad de varias enzimas, controlando reacciones fisiológicas importantes como la vasodilatación y la agregación plaquetaria. El GMPc es un importante mensajero en el sistema nervioso, sobre todo a nivel de células fotorreceptoras y neuronas CA3 de hipocampo (Kosarikov y cols., 2001).

En el páncreas exocrino, el aumento de GMPc junto con incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ son eventos de suma importancia involucrados en la secreción enzimática (Niebergall-Roth y Singer 2003).

2.8.4 Fosfolipasa A₂ (PLA₂) y ácido araquidónico

Las PLA₂ forman una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del segundo grupo acilo y el glicerol de la estructura de los fosfolípidos. La PLA₂ cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina y fosfolípidos de la membrana plasmática (Axelrod y cols., 1988), generando diversas sustancias bioactivas, como los lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, principalmente el ácido araquidónico (AA), que son precursores de mensajeros implicados en la señalización intracelular, como las prostaglandinas (PG), los leucotrienos y los tromboxanos (TX) (Clark y cols., 1995).

Existen dos grandes clases: las PLA₂ intracelulares o citosólicas (PLA_{2c}), de masa molecular elevada (40-85 kDa), y las PLA₂ de secreción (PLA_{2s}), de masa molecular pequeña (14-18 kDa) (Clark y cols., 1995; Dennis 1994). La actividad de la PLA₂ está regulada por muchos factores que se interrelacionan entre sí. La PKC y tirosinas cinasas regulan la actividad de la PLA₂ mediante fosforilación de una proteína.

El AA liberado por la acción de la PLA₂ es precursor de la síntesis de leucotrienos, PG, TX, prostaciclina (PGI) y eicosanoides, que presentan de gran actividad biológica. Además el AA es un activador de la enzima PLC (Balsinde y cols., 2002).

En el páncreas, los niveles intracelulares de AA modulan la propagación de las olas de Ca^{2+} . En este sentido, se ha observado que los receptores de alta afinidad de CCK y los receptores de ACh están acoplados a las cascadas de activación de la PLA₂ (Gonzalez y cols., 1999; Siegel y cols., 2001). Los principales grupos de PLA₂ están presentes en el SNC (Sun y cols., 2004). La cascada de señales mediadas por la PLA₂ también se ha descrito en astrocitos en respuesta a la activación de los mGluR (He y cols., 2012).

2.8.5 Fosfolipasa C (PLC) e inositol trifosfato (IP₃)

La fosfolipasa C (PLC) es una familia de enzimas solubles con un peso molecular que varía entre 85 y 150 kDa. La activación de la PLC produce la hidrólisis del enlace fosfodiéster entre el diacilglicerol (DAG) y el grupo fosfato del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂), liberando el propio DAG e inositol n,n,n-trifosfato defínelo (IP₃) (Sternweis y Smrcka 1992).

El PI(4,5)P₂ es fosforilado en la posición 3 del anillo de inositol por la familia de las PI₃-cinasa (PI₃K); el resultado es la formación de una gran familia de segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (IP₃), que regula una amplia variedad de respuestas celulares (Toker y Cantley 1997).

El IP₃ es un mensajero intracelular que estimula la liberación de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares a través de la unión a sus receptores localizados en la membrana de dichos depósitos (Berridge y Irvine 1989).

El DAG es una familia de lípidos que presentan una misma estructura. Este agente es el activador fisiológico de la PKC, que a su vez, tiene la capacidad de activar a más proteínas cuando las fosforila en residuos de serina o treonina. La PKC es una proteína ubicua de la que se han descrito al menos once subtipos (Nishizuka 1992).

En el páncreas exocrino los receptores de CCK y de ACh están acoplados a la generación de IP₃ a través de la PLC (Johnson 1994). Por su parte, en astrocitos de hipocampo, los receptores metabotrópicos GLUR5, α₁-adrenergicos o de adenosina están acoplados a la PLC con la consecuente liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares (Porter y McCarthy 1997).

2.8.6 Fosfolipasa D (PLD)

La fosfolipasa D (PLD) es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato y el grupo polar de fosfatidilcolina (PC), liberando ácido fosfatídico (PA), que puede ser metabolizado a DAG. La PLD puede participar en la regulación de PLA₂ (Hodgkin y cols., 1998).

En condiciones fisiológicas, la activación de PLD requiere un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la activación de varias proteínas intracelulares como la PKC, la GTPasa de bajo peso molecular, Rho, y tirosina cinasa (Halenda y cols., 1996; Martinson y cols., 1994).

En el páncreas, la cascada de señalización mediada por PLD, está acoplada con la activación de los receptores de CCK de baja afinidad (Gonzalez y cols., 1999). Por otra parte, en el caso de los astrocitos, la activación de los receptores de glutamato metabotrópicos induce un aumento de la actividad de la PLD de manera dependiente a la PKC pero independiente de Rho (Servitja y cols., 2003).

2.8.7 Proteínas cinasas

Las proteínas cinasas son proteínas capaces de modificar otras proteínas mediante la fosforilación de las mismas en residuos de serina, treonina o tirosina. Las proteínas cinasas tienen gran importancia en la señalización intracelular.

La actividad de la PKA depende de la activación por el AMPc tanto en astrocitos como en el páncreas (Gonzalez y cols., 1999; Huneycutt y Benveniste 1995). En el caso de la PKC, requiere la presencia de DAG y fosfolípidos para su activación; además, las denominadas PKC convencionales requieren la presencia de Ca^{2+} (Mellor y Parker 1998). Se ha descrito que en el páncreas, la propagación de las olas de Ca^{2+} está modulada por la PKC (Gonzalez y cols., 1999). Otro grupo de proteínas cinasas son las Ca^{2+} /calmodulina proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina, que regulan el complejo Ca^{2+} /calmodulina; este grupo de cinasas están implicados en diferentes cascadas proteicas, que regulan procesos como el aprendizaje y la memoria (Yamauchi 2005). La actividad de la proteína cinasa G (PKG), para que pueda ejercer su acción de fosforilación de proteínas, necesita la presencia de GMPc, lo cual ocasiona la fosforilación de SERCA (bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico), permitiendo el transporte de Ca^{2+} a los almacenes intracelulares (Bootman y cols., 2001). Además de las mencionadas, existen más tipos de proteínas cinasas; algunas de ellas son solubles, y forman parte de cascadas enzimáticas de señalización celular. Todas estas proteínas pueden actuar sobre los canales iónicos de las células, activarse o inhibirse, o incluso

unirse a determinadas regiones del ADN, aumentando la expresión de algunos genes (Hanks y cols., 1988).

2.8.8 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Las células necesitan una correcta regulación de la expresión de sus genes para su supervivencia. Las vías de transducción de la señalización intracelular tienen enorme importancia para una adecuada regulación génica. En células eucariotas, la fosforilación de factores proteicos intracelulares seguida de transcripción génica específica, es un mecanismo universal de funcionamiento de estas señales de transducción.

Una de las vías más estudiadas es la de las proteínas-cinasas activadas por mitógenos, también llamadas MAP-cinasas (del inglés mitogen-activated protein kinase - MAPK-). Estas proteínas constituyen una familia de enzimas conservadas evolutivamente; son cinasas de serina-treonina que median muchas vías de señalización intracelulares implicadas en los procesos proliferativos, la diferenciación, el crecimiento, la migración celular, así como en la apoptosis (Roux y Blenis 2004). Las MAP-cinasas se componen de cuatro grupos principalmente, ERK1/2, c-Jun N-terminal cinasas, p38s y ERK5 (BMK), aunque se han identificado algunos miembros adicionales como ERK3 y ERK4 (Chen y cols., 2001).

Las MAPKs pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos diferentes; pero en general, las ERKs se activan preferentemente en respuesta a factores de crecimiento y esteroides de forbol, mientras que las JNKs y las p38 MAPKs responden a estímulos de estrés que van desde el choque osmótico y la radiación ionizante a la estimulación por citoquinas (Pearson y cols., 2001).

Su activación da lugar a reacciones por fosforilación secuencial de distintas proteínas en cascada que finaliza con la activación de la transcripción de genes en el núcleo de la célula, aunque pueden activar otras cinasas y fosfolipasas citosólicas, así como proteínas del citoesqueleto. Las MAP cinasas, a su vez, son activadas por MAPKK específicas (figura 13): MEK1/2 para ERK1/2, MKK3/6 para p38, MKK4/7 (JNKK1/2) para JNK y MEK5 para ERK5. Cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK, aumentando así la complejidad y la diversidad de las señales (Chang y Karin 2001).

ERK1/2 se han relacionado preferentemente con proliferación y diferenciación, mientras que JNK y p38, parece estar más vinculado con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis, aunque hay excepciones, y tanto JNK como p38 pueden mediar efectos pro y anti apoptóticos (Pearson y cols., 2001).

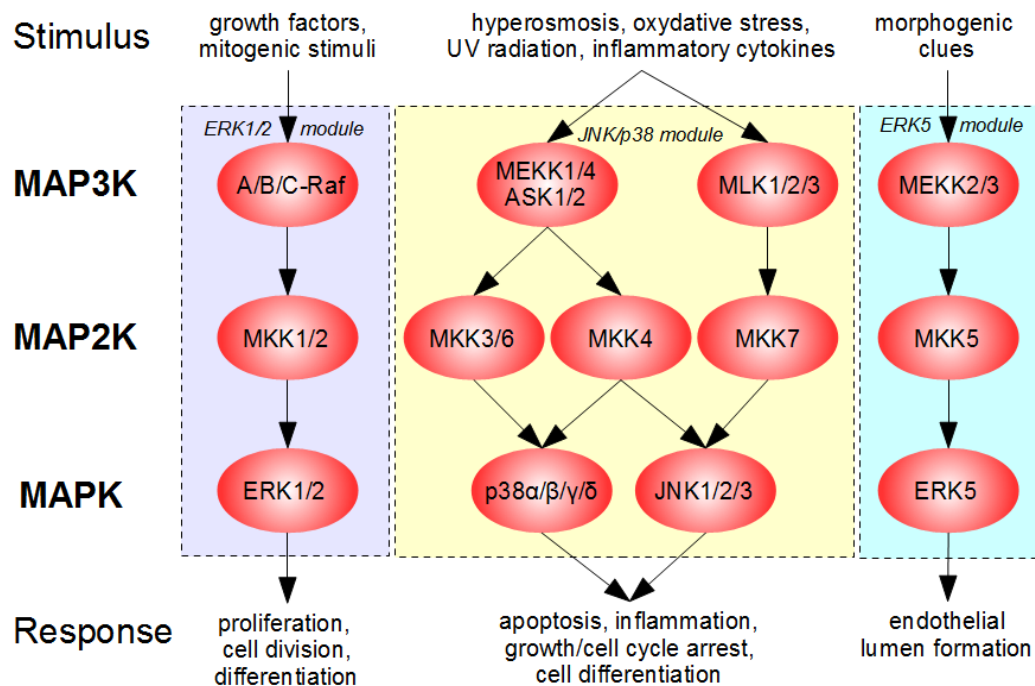


Figura 13. Cascada de señalización de las MAPKs.

2.8.8.1 MAPKs que fosforilan el extremo N-terminal de c-Jun

La vía de señalización de JNK (cinasa del NH2 terminal de C-Jun) se relaciona con la proliferación celular y la apoptosis. Evolutivamente es una proteína muy conservada, constituida por un dominio común de anclaje (*common docking domain*) en el extremo C-terminal y un dominio quinasa con residuos de fosforilación y un dominio glutamato/aspartato cerca del extremo N-terminal. Las cinasas JNK se codifican por tres genes, *jnk-1*, *jnk-2*, *jnk-3*. Estos tres genes producen 10 o más isoformas distintas de las JNKs. Las isoformas caracterizadas son la JNK1, JNK2 y JNK 3, que comparten una homología de aminoácidos de hasta el 85% en mamíferos. Estas proteínas tienen pesos

moleculares de 46 Kda (JNK-1 α , JNK-2 α) y 54 KDa (JNK-1 β , JNK-2 β), mientras que las isoformas de JNK-3 tienen pesos moleculares de 48 Kda, en el caso de la JNK-3 α , y 57 Kda, en el de la JNK-3 β . Las JNK-1 y JNK-2 se expresan de forma ubicua, mientras que la expresión de la JNK-3 tiene lugar principalmente en el cerebro (Davis 2000; Pearson y cols., 2001; Vallerie y Hotamisligil 2010).

Una vez activas, las JNKs pueden fosforilar a diferentes proteínas nucleares y citoplasmáticas. El principal sustrato de las JNKs es el factor de transcripción inducible c-Jun, que es fosforilado en los residuos serina 63 y serina 73 (Barr y cols., 2002). Además de c-Jun, las JNKs pueden fosforilar a otros factores de transcripción tales como ATF2 (Activating Transcription Factor), dicha fosforilación afecta a la actividad transcripcional de JNK y a la expresión de proteínas cuyo nivel de transcripción regulan (Dunn y cols., 2002; Roux y Blenis 2004).

La ruta de señalización de las JNKs participa en diferentes procesos celulares como la proliferación celular y la apoptosis, la organogénesis durante el desarrollo del embrión, la respuesta inmune mediante la expresión de citoquinas, la migración celular o la integridad del citoesqueleto (Meng y Xia 2011; Nishina y cols., 2004; Sun y cols., 2007). Las JNKs, debido a su participación en dichas rutas de señalización, han sido propuestas como dianas terapéuticas como por ejemplo en el Alzheimer, cáncer, enfermedades inflamatorias o la diabetes (Sabapathy 2012).

2.8.8.2 MAPKs reguladas por factores extracelulares (ERKs)

Las ERKs fueron las primeras MAPKs identificadas, por lo que se han utilizado como modelo para el estudio de las otras vías de señalización homólogas descubiertas con posterioridad. Tienen pesos moleculares de 44 KDa y 42 KDa respectivamente, por lo que también se las conoce con el nombre de p42/p44 MAPK.

Además de por los estímulos arriba mencionados, las ERKs se activan por ligandos de los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, estrés osmótico y eventos como la desorganización de los microtúbulos (Rubinfeld y Seger 2005).

Antecedentes bibliográficos

En esta vía de señalización encontramos las denominadas proteínas Ras, las cuales modulan muchos aspectos funcionales de la célula, incluyendo la proliferación, la diferenciación, la motilidad y la muerte celular. La única función enzimática conocida de Ras es su actividad GTPasa, por lo demás no es capaz de modificar directamente a ningún posible sustrato (Shields y cols., 2000). En la actualidad se conocen varios efectores de Ras que desempeñan funciones diversas regulando tanto acciones anti-apoptóticas (Raf, la fosfatidilinositol 3-quinasa y Tiam1) como pro-apoptóticas (Nore1 y RASSF1). Otros efectores de Ras son los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, factores activadores de la actividad GTPasa, proteínas adaptadoras, lipasas y la serina-treonina quinasa (Repasky y cols., 2004).

Se ha visto que los receptores con actividad tirosina quinasa están implicados en la generación de señales mitogénicas en la cascada Raf/MEK/ERK a través de las diferentes isoformas de las proteínas Ras (Cseh y cols., 2014).

Entre las proteínas que pueden fosforilar a las distintas isoformas de Raf se encuentran la PKC, PKA o PKB (Liebmann 2001). Raf activo se une y fosforila a las quinasas de especificidad dual MEK1 y MEK2 las cuales, a su vez, fosforilan en residuos de treonina y tirosina a ERK1 y ERK2 (Zebisch y cols., 2007). Los sustratos de las ERKs se encuentran en diferentes compartimentos celulares, incluyendo a proteínas integrales de membrana, sustratos nucleares como factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto y algunas proteínas quinasas (Roskoski 2012).

Las ERKs están implicadas en procesos de proliferación y diferenciación celular, reorganización del citoesqueleto de actina y migración celular. Además, estas proteínas también participan en la respuesta al estrés y la muerte celular (Lu y Xu 2006).

2.8.8.3 MAPKs activadas por mitógenos de 38 KDa o p38 MAPKs

La p38 MAPK fue descrita inicialmente como un polipéptido de 38 KDa que se fosforilaba en tirosina en respuesta al choque osmótico o al tratamiento con endotoxinas, como una proteína diana de drogas con actividad antiinflamatoria y como una quinasa que se activaba por procesos de estrés celular o por la citoquina IL-1 α .

Hasta la fecha se han descrito cuatro isoformas de p38 MAPKs, todas implicadas en procesos celulares de respuesta a situaciones de estrés celular como estrés oxidativo, radiación ultravioleta, hipoxia o isquemia, y citoquinas pro-inflamatorias como la interleucina-1 o el factor de necrosis tumoral alfa (Chen y cols., 2001). Las cuatro isoformas de las p38 MAPKs presentan un 60 % de homología en su secuencia.

La cascada principal de activación de las p38 MAPKs la formarían las siguientes quinasas: las MAPKKKs que incluyen a la familia de las MEK quinasas, principalmente la MEKK4, la TGF- β quinasa 1 (TAK 1) y la quinasa reguladora de apoptosis (ASK1); las MAPKKs MKK3 y MKK6 (también llamadas MEK3 y MEK6 respectivamente) y las MAPKs que incluyen a las cuatro isoformas de la p38 (α , β , γ y δ) (Cuadrado y Nebreda 2010; Roux y Blenis 2004).

Las MAPKKKs, pueden ser activadas por numerosos estados de estrés celular, tanto físicos como químicos. Una vez que están activas, fosforilan en residuos de serina y treonina a la MEK3 y a la MEK6. Estas proteínas muestran un alto grado de especificidad por p38, no activando las rutas de JNK o ERK1/2 (Brancho y cols., 2003). La MEK3 y la MEK6 activas fosforilan a las distintas isoformas de p38 pero mientras que la MEK6 activa a todas las isoformas de p38, la MEK3 es más selectiva y fosforila principalmente a las isoformas p38 α y p38 β . De esta forma, las cuatro isoformas de la p38 MAPK son activadas por doble fosforilación en residuos de treonina y tirosina (Enslin y cols., 2000).

Las p38 MAPKs activas fosforilan a un gran número de sustratos celulares, entre ellos la PLA, factores de transcripción como ATF1 y ATF2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF- κ B, Ets-1, y p53 (Cuadrado y Nebreda 2010; Kyriakis y Avruch 2001). A su vez, p38 también activa MAPKAP2, MAPKAP3 y MAPKAP5 (Ronkina y cols., 2007). Por último, p38 α parece jugar un papel importante en la regulación del ciclo celular y la supervivencia, actuando como inhibidor en la progresión del ciclo en las transiciones G₁/S y G₂/M, manifestando así un papel proapoptótico (Cargnello y Roux 2011).

2.9 Señalización celular mediada por el ion Ca²⁺

El ion Ca²⁺ es el mensajero intracelular más distribuido universalmente. Los cambios en su concentración intracelular controlan una gran diversidad de procesos celulares, desde el inicio de la vida, donde la rápida elevación de Ca²⁺ en el momento de la fertilización estimula el desarrollo, hasta las células especializadas donde regula funciones celulares específicas: contracción muscular, excitabilidad neuronal, y secreción de enzimas digestivas, así como de neurotransmisores, cambios en el estado redox o la muerte celular programada o apoptosis (Missiaen y cols., 2000; Monteith y Roufogalis 1995; Smaili y cols., 2000).

El mecanismo de acción del Ca²⁺ es el siguiente: cuando la célula está en reposo, la [Ca²⁺]_i se encuentra aproximadamente en valores cercanos a 100 nM, con variaciones dependiendo del tipo celular; cuando las células reciben determinados estímulos, entonces la [Ca²⁺]_i puede aumentar a 500-1000 nM. Las células tienen elementos en las membranas y en los orgánulos citoplasmáticos (como por ejemplo canales iónicos), así como proteínas citoplasmáticas (como la calmodulina, la troponina C o la calpaína), que son sensibles a los cambios en la [Ca²⁺]_i, y que participan en la transducción de la información en respuestas específicas (Hosfield y cols., 1999; Meldolesi y cols., 1990).

En las células existen mecanismos implicados en la movilización del Ca²⁺ intracelular, que incrementan o disminuyen la [Ca²⁺]_i. Entre los primeros están los mecanismos que liberan Ca²⁺ desde depósitos intracelulares y aquellos que median su entrada desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática (Berridge y cols., 2000). Entre los segundos, se encuentran aquellos que almacenan Ca²⁺ en los depósitos intracelulares, a través de la bomba Ca²⁺-ATPasa de la membrana del retículo sarcoplasmático (SERCA) o en el interior de las mitocondrias (Gonzalez y cols., 2000), y los que extraen Ca²⁺ de la célula, a través de la bomba Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) o por medio del intercambiador Na⁺/Ca²⁺. Ambos tipos de mecanismos, los que aumentan la [Ca²⁺]_i y los que la disminuyen, pueden activarse simultáneamente o de forma secuencial (Brini y cols., 2012).

Para que actúe como señal se requiere un incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, pero si este incremento es excesivo y se prolonga en el tiempo, puede ser

perjudicial para la célula, siendo la base de determinados desórdenes que pueden llevar a la célula a la muerte por necrosis o apoptosis (Roy y Hajnoczky 2008). Es por esto que la homeostasis del Ca^{2+} dentro de la célula debe estar altamente regulada.

Fundamentalmente, la homeostasis del Ca^{2+} celular es mantenida por un transporte coordinado del ion Ca^{2+} a través de las diferentes membranas, así como por el amortiguamiento a cargo de proteínas citosólicas y las presentes en los compartimentos intracelulares. Estos mecanismos colaboran para que diferentes concentraciones de este ion, dentro de unos rangos fisiológicos, jueguen su papel en la señalización intracelular (Berridge y cols., 2003; Carafoli 2004).

2.9.1 Depósitos de calcio intracelulares

El Ca^{2+} se distribuye en distintos compartimentos en el interior celular. El principal depósito lo constituye el retículo endoplásmico (RE), pero además se ha puesto de manifiesto el papel de otros orgánulos, como el complejo de Golgi y los gránulos de secreción como depósitos de Ca^{2+} dinámicos, modificando su contenido en Ca^{2+} como consecuencia de las variaciones de la concentración citosólica del ion (Chandra y cols., 1991; Patel y Docampo 2010). La mitocondria es otro orgánulo que se ha sugerido que participa en el control de la $[\text{Ca}^{2+}]$; se considera que no contiene Ca^{2+} movilizable en respuesta a la estimulación de la célula por sus agonistas, pero interviene en la homeostasis del Ca^{2+} captando grandes cantidades de dicho ión durante la estimulación celular (Gonzalez y cols., 2000; Montero y cols., 2000) o bajo condiciones patológicas (Saris y Carafoli 2005).

2.9.1.1 Retículo endoplásmico

El RE es un orgánulo intracelular presente en todos los tipos de células eucariotas. Aparece como una estructura reticular, de túbulos interconectados, teniendo un lumen muy denso que contiene numerosos sistemas de enzimas. Sus membranas se continúan con las de la envuelta nuclear y se pueden extender hasta las proximidades de la membrana plasmática, llegando a representar más de la mitad de las

membranas de una célula. Tiene un alto grado de plasticidad, lo que le permite tener una organización estructural muy heterogénea y está implicado principalmente en los procesos celulares de señalización y síntesis de proteínas y posterior procesamiento post-traducciona.

El RE recibe señales de mensajeros intracelulares como el Ca^{2+} , el IP_3 , esfingolípidos, especies reactivas oxígeno (ERO), alcaloides y esteroides (Gonzalez y cols., 2002; Young y Nahorski 2002). En respuesta a ellos, el RE contribuye con una serie de señales como la liberación de Ca^{2+} acumulado, de AA, activación de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (SOCs), o la generación de determinadas señales de estrés que conducen a la activación de diferentes factores de transcripción (NF- κ B, CHOP, ATF-6 y SREBPs) (Belmont y cols., 2008) (Mekahli y cols., 2011).

Para llevar a cabo la señalización por Ca^{2+} , el RE posee receptores de IP_3 (IP_3R) y receptores de rianodina (RyR), responsables ambos de la liberación de Ca^{2+} en respuesta a estímulos. El relleno de Ca^{2+} del RE ocurre cuando los canales de liberación de Ca^{2+} están cerrados, y lo llevan a cabo las bombas SERCA (Pozzan y cols., 1994). En condiciones basales, la $[\text{Ca}^{2+}]$ del RE no es estática, sino que existe un equilibrio entre el bombeo de Ca^{2+} al interior del RE por parte de las SERCA y una salida pasiva de Ca^{2+} . El RE también actúa como tampón de Ca^{2+} , ya que en su interior existe una serie de proteínas de unión al Ca^{2+} , como la calnexina y la calreticulina, que además participan en la regulación de la actividad de las SERCA (Roderick y cols., 2000).

Para la distribución de la señal de Ca^{2+} a través de la célula, el RE utiliza un proceso regenerativo denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). De esta forma, el Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular o el liberado desde los depósitos citoplasmáticos induce la apertura de los canales de liberación de Ca^{2+} del RE, un fenómeno particularmente importante en células cardíacas y neuronas (Berridge 2002; Gyorke y cols., 2002).

El RE también contribuye a la señal de Ca^{2+} que controla procesos como la excitabilidad neuronal, la exocitosis en el terminal pre-sináptico, la plasticidad sináptica y la apoptosis (Lam y Galione 2013).

2.9.1.2 Mitocondria.

La mitocondria constituye el principal lugar de generación de energía para la célula. Es un orgánulo de pequeño tamaño con un funcionamiento parcialmente independiente al resto de la célula, ya que posee ADN propio y tiene ritmos de replicación y síntesis de algunas proteínas propias.

Se ha dedicado mucha atención en las últimas décadas a la participación de las mitocondrias en la homeostasis del Ca^{2+} , siendo conocida desde finales de 1960 su capacidad de acumular Ca^{2+} . La mitocondria tiene un papel regulador en la concentración de Ca^{2+} intracelular en muchos tipos de células, incluyendo astrocitos y células pancreáticas (Criddle y cols., 2007; Wang y cols., 2009). La localización estratégica de las mitocondrias cerca de los lugares donde se producen las cascadas intracelulares de entrada y salida de Ca^{2+} , hace que estos orgánulos estén presentes en microdominios con alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$, permitiéndoles acumular el ion incluso cuando tienen lugar pequeños aumentos de concentración global de Ca^{2+} (Contreras y cols., 2010).

La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se produce a través de un transportador selectivo dependiente de energía, llamado uniporter de Ca^{2+} . Este mecanismo está localizado en la membrana interna de la mitocondria. Este transportador se activa en situaciones en las que la concentración citosólica de Ca^{2+} es muy alta ($> 10 \mu\text{M}$), por lo que induce una recaptación masiva. Se ha sugerido que esta captación de Ca^{2+} tiene lugar generalmente en los microdominios de Ca^{2+} mencionados, áreas cercanas a los canales de Ca^{2+} del RE (Spat y cols., 2009).

Asimismo, la mitocondria mantiene su concentración intraluminal de Ca^{2+} gracias a la expresión de los intercambiadores iónicos o *antiporters* de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Walsh y cols., 2009). Por otra parte, la extrusión de Ca^{2+} al citosol, en mecanismos fisiopáticos o previos a la muerte celular, también puede ser promovida por CICR mitocondrial, pudiendo participar el uniporter de Ca^{2+} o el poro de transición mitocondrial (Icha y cols., 1997; Montero y cols., 2001).

La proximidad que existe entre el RE y la mitocondria favorece la cooperación entre estos dos orgánulos en el mantenimiento de la homeostasis y la señalización del Ca^{2+} . Las mitocondrias parecen ser capaces de regular todos los componentes de la

maquinaria de señalización de Ca^{2+} , incluyendo la liberación de Ca^{2+} a través de la estimulación de IP_3R y RyR , mecanismos dependientes de ATP (Bull y cols., 2007; Park y cols., 2008). Asimismo la mitocondria participa en la regulación de la señalización de los SOC's, así como en la captación y extrusión de Ca^{2+} (Hoth y cols., 1997; Santo-Domingo y Demaurex 2010).

El posicionamiento estratégico de grandes grupos de mitocondrias (por ejemplo, en la inmediaciones de la membrana plasmática, alrededor del núcleo o delimitando la zona de los gránulos de secreción) puede limitar la señalización de calcio citosólico a una región específica del citoplasma. Las células acinares pancreáticas proporcionan un interesante ejemplo de la capacidad de las mitocondrias para delimitar en el citosol compartimientos de señalización y de como la participación de las mitocondrias perigranulares restringen las señales de Ca^{2+} a la región apical (Kasai y cols., 1993; Park y cols., 2001).

2.9.1.3 Aparato de Golgi.

El aparato de Golgi (AG) juega un papel central en la modificación post-traducciona l y la clasificación de lípidos y proteínas. Morfológicamente el orgánulo es heterogéneo y es posible distinguir pilas o cisternas planas, redes tubuloreticulares y vesículas.

Junto con el RE, el AG participa en la señalización por Ca^{2+} actuando como depósito intracelular durante la estimulación celular. Un claro ejemplo de ello es la presencia de receptores de IP_3 en la membrana del AG (Pinton y cols., 1998). Por el contrario, no se han hallado RyR en la membrana del AG. Tampoco se ha observado liberación de Ca^{2+} desde este orgánulo mediada por factores de liberación clásicos, como ribosa ADP cíclica (cADPR) o el nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP) (Dolman y Tepikin 2006; Surroca y Wolff 2000).

Por otra parte, la captación de Ca^{2+} en este orgánulo es llevada a cabo por dos grupos de bombas: las SERCA y las (SPCA) (Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase) (Li y cols., 2013). En el AG se han encontrado distintas proteínas de unión a Ca^{2+} como CALNUC,

Cab45 y p54/NEFA que posiblemente funcionan de una manera similar a la calreticulina en el RE (Dolman y Tepikin 2006).

2.9.1.4 Vesículas secretoras.

Las vesículas secretoras son orgánulos ácidos en cuyo interior hay un pH de 5.5. Esta diferencia con respecto al pH citosólico es la principal característica que se ha señalado como necesaria para la acumulación de grandes concentraciones de Ca^{2+} en su interior (Ozawa y Schulz 1991). En el interior de estas vesículas, el Ca^{2+} está asociado con proteínas, en particular las cromograninas (Alvarez 2012). Además, se ha demostrado que cuando desaparece esta diferencia de pH entre el interior de la vesícula y el citosol se promueve la fuga de Ca^{2+} , aumentando drásticamente el movimiento de vesículas secretoras y desencadenando la exocitosis (Borges y cols., 2012).

2.9.2 Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares

La liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares se produce a través de la apertura de canales, que van a conducir a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pudiendo generar señales con características espaciales y temporales diferentes, dando lugar a las llamadas “oscilaciones” de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y “olas de Ca^{2+} ”.

Existen tres familias de canales responsables de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos internos: los receptores del IP_3 , los receptores de rianodina y los receptores del NAADP (Gerasimenko y cols., 2006).

Se han descrito dos mecanismos alternativos para abrir estos canales, bien por interacción directa proteína-proteína, o bien a través de una molécula que difunde desde la membrana celular hasta el canal de Ca^{2+} , como puede ser el propio Ca^{2+} , el IP_3 , la adenosina difosfato ribosa cíclica (ADPRc) o el NAADP.

2.9.2.1 Canal iónico-receptor de IP₃

Es un canal aislado por primera vez en el cerebelo de rata (Furuichi y cols., 1989). Tiene 3 dominios, uno de unión al IP₃, localizado en su extremo N-terminal, otro regulador, que contiene un sitio de unión a ATP y sitios susceptibles de fosforilación, y, por último, un extremo C-terminal con 6 regiones que atraviesan la membrana (Taylor y Richardson 1991). La unión del IP₃ al receptor provoca un cambio conformacional en la proteína que da lugar a la apertura del canal. El agonista fisiológico es el IP₃, cuyo precursor, el PI(4,5)P₂, es hidrolizado por la PLC en DAG e IP₃, el cual difunde en el citosol hasta alcanzar su receptor.

La liberación de Ca²⁺ a través de estos receptores sigue un patrón cuantal, liberándose por cada molécula de IP₃ unas 20 de Ca²⁺ (Berridge y Irvine 1989). A su vez, estos receptores están modulados bifásicamente por el Ca²⁺ citosólico, aumentando su probabilidad de apertura a concentraciones bajas (0.5- 1μM) y reduciéndose cuando el Ca²⁺ está a mayores concentraciones (Bezprozvanny y cols., 1991). Esta regulación parece tener una gran importancia en la distribución espaciotemporal de la señal de Ca²⁺ oscilatoria en las células del páncreas (Taylor y Laude 2002).

2.9.2.2 Canal iónico-receptor de rianodina

Al igual que el IP₃R, el RyR tiene 3 dominios estructurales y suelen adoptar una conformación tetramérica. Los RyR fueron inicialmente identificados en las células musculares, donde se observó su gran afinidad por el alcaloide vegetal rianodina. El receptor de la rianodina se activa a bajas concentraciones de rianodina (inferiores a 10 μM), ya que a concentraciones superiores, la rianodina actúa como un inhibidor farmacológico (Imagawa y cols., 1987).

El principal agonista fisiológico es el Ca²⁺, que jugaría un papel activador a concentraciones inferiores a 1 mM mediante el mecanismo de CICR. Entre los activadores también encontramos el ADPRc (Gerasimenko y cols., 1996) y como agonista destacado, la cafeína (Sitsapesan y Williams 1990). La calmodulina actuaría como modulador de este canal llegando incluso a anular el efecto conjunto de la rianodina,

ADPRc y la cafeína (Ozawa 1999). Estos receptores han sido caracterizados en distintos tipos de células incluyendo las células acinares pancreáticas (Petersen 1995), y astrocitos y oligodendrocitos (Simpson y cols., 1998).

2.9.2.3 Canal iónico-receptor de NAADP

El NAADP, un derivado desaminado del nicotinadenín dinucleótido fosfato (NADP), que se ha presentado como un mensajero capaz de liberar Ca^{2+} de los depósitos internos. El NAADP libera Ca^{2+} de forma independiente al IP_3 y la rianodina y, a diferencia de ellos, su receptor no es activado por Ca^{2+} , siendo sensible únicamente a su agonista, el NAADP (Cancela 2001).

2.9.3 Entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular

En células excitables como las neuronas o las células musculares, así como en algunas células endocrinas, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular se produce a través de canales activados por voltaje. Éstos son canales selectivos para el ion Ca^{2+} , que permanecen abiertos mientras persiste el potencial de acción que provocó su apertura (Tsien y cols., 1995). Esta señal es entonces amplificada con la propia entrada de Ca^{2+} para activar la movilización de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} mediante el RyR, e incluso a través del propio IP_3R , mediante la CICR.

Por otro lado, en células no excitables, como las células epiteliales o los mismos astrocitos, no se encuentran canales operados por voltaje, por lo que la entrada de Ca^{2+} en este caso debe realizarse mediante otros mecanismos. Uno de los mecanismos más importantes es la entrada activada por el vaciamiento de los depósitos o entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC: del inglés “capacitative calcium entry”) (Putney 1986).

Los avances obtenidos mediante técnicas de pinzamiento de membranas han permitido describir una corriente de entrada de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+} (CRACs), que representa la primera evidencia electrofisiológica de la entrada capacitativa tras el vaciamiento de los depósitos (Hoth y Penner 1992).

La membrana plasmática contiene canales capaces de regular la entrada de Ca^{2+} , que han recibido denominaciones de acuerdo con el modo en que son controlados.

2.9.3.1 Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por voltaje

Estos canales son muy importantes en células excitables, por tanto, es frecuente encontrarlos en neuronas o células musculares donde se abren en respuesta a la despolarización de la membrana. Se han podido descubrir variedades de estos canales activados por voltaje gracias al empleo de fármacos que actúan específicamente sobre cada tipo de canal (Bootman y cols., 2000).

2.9.3.2 Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por receptor

Los canales activados por receptor agrupan a una familia de canales de gran variedad estructural y funcional, que se localizan sobre todo en células secretoras y en las terminaciones nerviosas, así como en los astrocitos. En este grupo se incluyen los receptores de GABA, presentes en múltiples zonas del cerebro, pero también en células inmunes, hígado, corazón, riñón, placenta, etc. (Xin y cols., 2001). También cabe mencionar los receptores nicotínicos de la ACh, localizados en el músculo esquelético, ganglios autónomos y sistema nervioso central (Albuquerque y cols., 2009), y los receptores purinérgicos P_2X , que se encuentran en las terminaciones nerviosas, tanto pre como postsinápticas, y en células gliales distribuidas en el sistema nervioso central, periférico y autónomo; igualmente, podemos encontrar los receptores P_2X en el músculo cardíaco, en el músculo esquelético y en el músculo liso (North 2002). También pertenecen a este grupo los receptores ionotrópicos de glutamato, cuya localización primordial es el sistema nervioso (Willard y Koochekpour 2013). La activación de estos receptores se lleva a cabo por la unión de sus agonistas al dominio extracelular (Collingridge y cols., 2009).

2.9.3.3 Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por segundos mensajeros

La apertura de algunos canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática se activa por segundos mensajeros, entre los que se encuentran los nucleótidos cíclicos o el DAG. Entre estos canales se encuentran los receptores metabotrópicos de glutamato, receptores de acetilcolina muscarínicos, receptores de GABAB, y la mayoría de los receptores de serotonina, así como los receptores de norepinefrina, epinefrina, histamina, dopamina, neuropéptidos y los endocannabinoides. La apertura de estos canales permite el paso de cationes monovalentes o divalentes, por lo que se trata de canales no selectivos para Ca^{2+} (Tu y cols., 2009).

2.9.3.4 Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados mecánicamente

Los canales activados mecánicamente se encuentran en casi todas las células y responden sobre todo a la deformación, también se denominan “stretch channel”. Estos canales responden a estímulos inducidos en la célula, como son el stress, el estiramiento, etc. Un ejemplo estos canales de Ca^{2+} lo encontramos en las células de la epidermis de la tráquea (Bootman y cols., 2001). Los astrocitos también presentan este comportamiento en situaciones de estrés mecánico en traumatismos en los que el tejido sufre tensión y estiramiento (Rzigalinski y cols., 1998).

2.9.3.5 Entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por el vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca^{2+}

La entrada de Ca^{2+} a través de un tipo especial de canales de la membrana plasmática también puede ser activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , bien en respuesta a mensajeros fisiológicos o por agentes farmacológicos (Putney 1986). Esta modalidad de entrada se denomina con las siglas ECC, ya que este canal no permite la entrada de Ca^{2+} mientras los depósitos están llenos. El mecanismo se basa en la transmisión de una información desde los almacenes de

Ca^{2+} , que se han vaciado, a la membrana plasmática, que activaría el movimiento del ion.

Recientemente se ha descrito que el sensor que indica el vaciado del retículo endoplásmico es la molécula de interacción del estroma-1 (STIM-1). STIM-1 posee un dominio EF-hand de unión al Ca^{2+} en su región localizada en el interior del retículo. Cuando la concentración de Ca^{2+} del RE desciende, STIM tiende a unirse con proteínas de la membrana celular para formar un poro de entrada de Ca^{2+} . Orai-1 se ha propuesto como principal candidato a ser la proteína de unión que conforma junto con STIM1 el canal de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Luik y cols., 2006). También contribuyen a este fenómeno los denominados transient receptor potential channels (TRPCs), habiéndose descrito que STIM-1 también funciona como sensor para estos canales. Existen estudios que apuntan la posibilidad de formación de un trímero STIM-1/TRPC/Orai-1 que intervenga en la ECC de las células acinares pancreáticas (Hong y cols., 2011).

2.9.4 Mecanismos de salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática

2.9.4.1 El intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$

Se encuentra en la membrana plasmática y utiliza la energía del gradiente electroquímico del Na^+ para extraer Ca^{2+} de la célula (Philipson y Nicoll 2000). Este mecanismo está especialmente desarrollado en células excitables, como las neuronas. Este intercambiador puede funcionar en ocasiones a la inversa e introducir Ca^{2+} al interior celular, como ocurre en el potencial de acción de los cardiomiocitos. Este fenómeno está mediado por un cambio transitorio en la concentración de Na^+ justo en las zonas próximas a la membrana plasmática, lo cual invierte la dirección del movimiento iónico, con lo que el Ca^{2+} tiende a entrar. El cambio de dirección cesa cuando el gradiente iónico del Na^+ retorna de nuevo al basal por la entrada de Ca^{2+} (Lipp y Niggli 1994).

2.9.4.2 Bomba Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA)

En la mayoría de las células esta bomba es la principal responsable de la salida de Ca^{2+} de la célula al exterior celular. La energía se obtiene del ATP, y el resultado es el transporte de Ca^{2+} en contra de un fuerte gradiente electroquímico. Se han identificado varias isoformas de PMCA, generadas por “splicing” alternativo de sus productos genéticos. La actividad de la PMCA está regulada por una gran variedad de mensajeros celulares, tales como la calmodulina, fosfolípidos ácidos, proteínas cinasas (PKA, G y C) y cinasas de residuos de tirosina. La regulación por Ca^{2+} -calmodulina representa un mecanismo de retroalimentación positivo, ya que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa la PMCA (Carafoli y Stauffer 1994; Strehler y Zacharias 2001).

2.9.4.3 Bomba Ca^{2+} -ATPasa del RE

La SERCA está localizada en la membrana del retículo sarco/endoplasmático. Su función es almacenar Ca^{2+} en el interior de este orgánulo citoplasmático. Su regulación se realiza mediante una proteína de membrana, fosfolambano, que inhibe la actividad SERCA_1 y SERCA_2 (pero no SERCA_3) por bloqueo de su sitio activo. Esta inhibición se relaja cuando el fosfolambano es fosforilado por PKA o proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (CAM cinasa II) (Metcalfe y cols., 2005).

El funcionamiento de esta bomba de Ca^{2+} puede ser inhibido por tapsigargina (Thastrup y cols., 1989), el ácido ciclopiazónico y la 2,5-di(ter-butil)-1,4,-hidroquinona (Cavallini y cols., 1995).

La figura 14 muestra una descripción esquemática de los sistemas que operan en la regulación y señalización de Ca^{2+} en un modelo celular genérico.

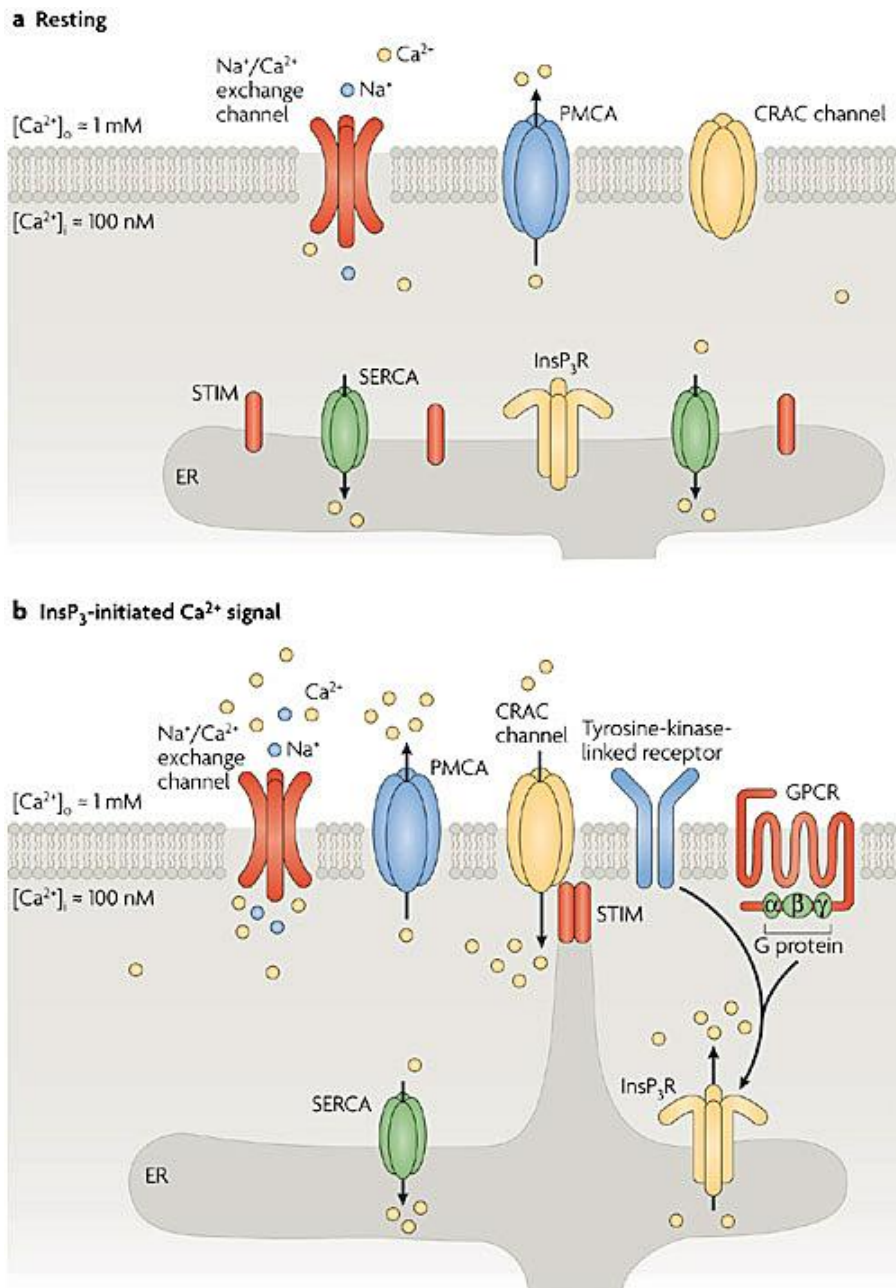


Figura 14. Descripción esquemática de los sistemas que operan en la regulación y señalización de Ca^{2+} .

2.10 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se ha definido como la ruptura del equilibrio existente entre la generación de factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes de los que dispone la célula (enzimáticos o no enzimáticos), encargados de eliminar o neutralizar los

primeros, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de prooxidantes. Este desequilibrio puede desencadenar daños en biomoléculas de importancia relevante en la célula, con el potencial impacto negativo que conlleva en el organismo. Ello trae como consecuencia alteraciones en la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, por lo que se reconoce como mecanismo general de daño celular. El estrés oxidativo se ha visto implicado en la etiopatogenia de numerosas enfermedades (Nair y cols., 2005), así como en el envejecimiento (Sohal y cols., 2002).

Las reacciones de tipo redox son la base del mecanismo de oxidación que tiene lugar en múltiples procesos orgánicos, tanto fisiológicos como patológicos. Los radicales libres, responsables del estrés oxidativo, pueden reaccionar con el ADN, los lípidos y las proteínas de las células, ocasionando mutaciones, transformaciones neoplásicas, pérdida de funciones celulares y la muerte celular. En condiciones normales los radicales libres y los daños que causan pueden ser controlados y reparados por los sistemas y las defensas celulares; sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo se acumulan y pueden provocar el mal funcionamiento de los sistemas celulares, dañando en sus estructuras y comprometiendo la supervivencia de las células (Poli y cols., 2005).

2.10.1 Radicales libres

Se conoce por radical libre a cualquier molécula, normalmente de bajo peso molecular, que contiene átomos con uno o más electrones desapareados en la órbita más externa. Esta configuración proporciona al radical libre una alta inestabilidad y reactividad, facilitándole una fuerte tendencia a atraer electrones de átomos presentes en otras moléculas, con el fin de recobrar su estado de equilibrio. De este modo, el radical libre queda reducido al recibir al electrón libre, mientras que la sustancia que lo cede quedará oxidada (Halliwell 1997). La mayoría de los radicales libres son derivados del oxígeno molecular, por lo que reciben el nombre de especies reactivas de oxígeno (ERO), aunque también pueden derivar del nitrógeno, recibiendo el nombre de especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Espey y cols., 2002).

El estudio de los radicales libres en organismos vivos dio comienzo a una nueva era después del descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y del convencimiento de que los radicales son importantes en la biología celular (McCord y Fridovich 1969). Numerosos investigadores orientaron sus estudios hacia el daño oxidativo producido por los radicales sobre el ADN, proteínas, lípidos y otros componentes de la célula.

Una nueva aproximación comenzó con la descripción de las ventajas de los efectos biológicos de los radicales libres. Se demostró que el anión superóxido, a través de su derivado el radical hidroxilo, estimulaba la activación de la guanilato ciclasa y la formación de GMPc (Mittal y Murad 1977). Se descubrió el papel del NO como una molécula reguladora en el control de la relajación del músculo liso y la inhibición de la adhesión en las plaquetas (Ignarro y Kadowitz 1985; Radomski y cols., 1987), así como en la inducción de la expresión de genes (Keyse y Tyrrell 1989) y la activación de factores de transcripción (Schreck y cols., 1991).

Actualmente, existen evidencias que indican que los organismos vivos no se han adaptado únicamente a una existencia no amistosa con los radicales libres, sino que han desarrollado mecanismos para aprovechar las ventajas del uso de éstos. Funciones fisiológicas importantes como la regulación del tono vascular, la potenciación de la transducción de señales en receptores de membrana o la regulación de funciones controladas por la concentración de oxígeno, implican a los radicales libres, y sus derivados. La regulación redox está actualmente llamando la atención del campo de la medicina, ya que se ha descubierto que el estrés oxidativo tiene un papel importante en numerosas enfermedades. Estas condiciones patológicas, demuestran la relevancia biológica de la regulación del estado redox, donde se trata de mantener el balance entre la producción y la eliminación de radicales libres.

2.10.2 Especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con

otras moléculas orgánicas en procesos de redox. El oxígeno molecular en estado fundamental, tiene dos electrones desapareados en el orbital externo, (también conocido como estado triplete). Como los dos electrones tienen el mismo *spin*, el oxígeno sólo puede reaccionar con un electrón cada vez y por tanto no es muy reactivo. Por otra parte, si uno de los dos electrones desapareados es excitado y cambia su *spin*, la especie resultante (conocida como oxígeno singlete) se convierte en un potente oxidante y los dos electrones con distinto *spin* pueden reaccionar rápidamente con otros pares de electrones.

Una primera hipótesis proponía que los radicales del oxígeno podían formarse como productos de reacciones enzimáticas *in vivo* y se describieron como los responsables de varios tipos de daño celular como mutagénesis, cáncer y procesos degenerativos (Harman 1956). Las ERO son productos del metabolismo celular, y pueden ser producidas en reacciones catalizadas enzimáticamente, pero también de una manera no enzimática. Estas moléculas juegan un papel vital en la estimulación de vías de señalización en células animales y vegetales en respuesta a cambios en las condiciones tanto intracelulares como extracelulares. No es una idea nueva que las ERO jueguen un papel importante en distintas vías de señalización celular; por ejemplo, en la década de los 90, se descubrió que el peróxido de hidrógeno se requiere para la señalización mediada por citoquinas, insulina, el factor de crecimiento, etc. (Finkel 1998).

Los diferentes tipos de ERO pueden participar en multitud de reacciones en las que pueden sufrir procesos de oxidación o reducción. Entre los diferentes tipos de ERO podemos citar:

- El anión superóxido O_2^- , que es un potente agente oxidante, y muy reactivo con el agua. Es producto de la reducción del O_2 por un electrón, y es considerado el precursor de la mayoría de las ERO. Una fuente importante de esta ERO es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, una enzima que cataliza la producción de O_2^- mediante O_2 y NADPH (Navarro-Yepes y cols., 2014).
- El peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- El radical hidroxilo (OH^\cdot) que es el más reactivo.

Antecedentes bibliográficos

El O_2^- puede reaccionar con otros radicales como el ON. El producto de esta reacción, el peroxinitrito ($ONOO^-$) es también un potente oxidante.

Cuando se acumulan en la célula, y no son detoxificados, los radicales libres son peligrosos para los seres vivos, ya que producen efectos negativos en la mayoría de componentes celulares. Las ERO pueden atacar a los glúcidos de forma variable. Mientras que los glúcidos mono y disacáridos resisten la acción de las ERO, glúcidos más complejos son despolimerizados por las ERO (Duan y Kasper 2011).

La acción de las ERO sobre los lípidos implica la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación, lo que induce una pérdida de flexibilidad de las membranas celulares (Burcham y Kuhan 1996; Kanner y cols., 1987). Esta reacción conduce a la formación de malondialdehído y los compuestos de dieno conjugado, que son citotóxicos y mutagénicos. Los radicales libres que más afectan a los lípidos son el radical hidroperóxilo y el oxígeno singlete (Pham-Huy y cols., 2008).

Las proteínas presentan tres puntos sensibles a las ERO, que son los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH). Así, las proteínas ricas en determinados aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histamina, metionina y cisteína) son susceptibles de ser atacados por las ERO. De ahí que éstas puedan generar cambios estructurales muy importantes en estas proteínas, que afectan a su actividad. También se puede ver incrementada la susceptibilidad a ataques proteolíticos (Davies 1987; Stadtman 1992). Además, las modificaciones proteicas podrían contribuir al daño secundario a otras biomoléculas, como por ejemplo, inactivando los enzimas reparadores de ADN o alterando el funcionamiento de las ADN polimerasas durante la replicación del ADN (Halliwell y Whiteman 2004).

Las ERO también pueden afectar directamente al ADN, ya que es una molécula muy compleja, que alberga en su estructura una gran cantidad de componentes sensibles al efecto de los radicales libres. De esta forma, los ácidos nucleicos pueden sufrir modificaciones en las bases nitrogenadas, la formación de aductos entre bases y glúcidos, uniones entre timina y tirosina, roturas de la hebra de ADN y enlaces cruzados con otras moléculas (Beckman y Ames 1998). Por ejemplo, los radicales hidroxilo oxidan los nucleósidos guanosina y timina a 8-hidroxi-2-desoxiguanosina y timinglicol, respectivamente, introduciendo por tanto cambios en el ADN (Lee y cols., 2004). Si el

estrés oxidativo es excesivo y los sistemas de reparación del ADN se ven superados, el daño oxidativo producido en el ADN puede dar lugar a la aparición de mutaciones, que pueden ser en último extremo responsables de enfermedades como el cáncer (Ames y cols., 1993). El ADN mitocondrial también puede ser dañado por las ERO, de manera incluso más drástica que el nuclear, ya que la proximidad de la cadena de transporte de electrones expone a este ADN a una gran cantidad de ERO; además, al no poseer histonas, puede ser más fácilmente atacado (Brunk y Terman 2002; Pham-Huy y cols., 2008).

2.10.3 Mitocondria y ERO

Un orgánulo citoplasmático que tiene gran importancia en la generación de ERO es la mitocondria, ya que la mayoría de estos compuestos son generados por la cadena respiratoria mitocondrial. El O_2^- es producido en la matriz mitocondrial por la reducción del O_2 en el complejo I, y en la matriz y en el espacio intermembrana por el complejo III de la cadena de transporte de electrones (Navarro-Yepes y cols., 2014). Anteriormente se ha mencionado que la mitocondria tiene implicaciones en la homeostasis del Ca^{2+} . Cuando el Ca^{2+} citosólico se incrementa sensiblemente en el interior celular, aparte de los mecanismos de extrusión que se vieron con anterioridad, la mitocondria también podía constituirse como un depósito transitorio de Ca^{2+} . Esta acumulación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria tiene algunas consecuencias en su funcionamiento, concretamente a nivel del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones. De esta forma, el Ca^{2+} entra en la matriz mitocondrial, y algunas enzimas del ciclo de Krebs pueden cambiar su patrón de actividad fisiológico en presencia de elevadas concentraciones del ión. En estas circunstancias se podría producir una aceleración del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, que a su vez, desembocaría en la generación de ERO. Por otro lado, una vez generadas, las ERO pueden actuar sobre las enzimas del ciclo de Krebs, conduciendo a la reducción de su actividad (Chinopoulos y cols., 1999; Murphy 2001).

Si bien las mitocondrias son la fuente fundamental de ERO en la célula, también constituyen el primer lugar de actuación de éstas. Sin embargo, las ERO pueden actuar

sobre todos los sistemas celulares, incluyendo los compartimentos de Ca^{2+} como el RE, contribuyendo a su liberación (Gonzalez y Salido 2001). De este modo, las ERO se podrían considerar como una espada de doble filo, en el sentido de que una excesiva movilización de Ca^{2+} y un incremento mantenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ conducen a la generación de ERO, mientras que una excesiva e incontrolada generación de ERO conduce a la movilización de Ca^{2+} e incrementos sostenidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Brookes y cols., 2004).

No obstante, también cabe destacar que a lo largo de las últimas décadas, ha habido numerosos artículos que destacan la importancia de la señalización dependientes de las ERO mitocondriales en una variedad de sistemas (Collins y cols., 2012). En su conjunto, estos datos sugieren que la generación de ERO mitocondriales se ha constituido como un método de comunicación entre la función mitocondrial y otros procesos celulares para mantener la homeostasis y promover la adaptación al estrés (Murphy 2006; Sena y Chandel 2012).

2.10.4 Sistema nervioso y estrés oxidativo

El cerebro es especialmente vulnerable al estrés oxidativo, debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de las membranas neuronales y las bajas defensas antioxidantes con que cuentan (dos Santos y cols., 2006). Hay que añadir además la elevada tasa metabólica que presenta este tejido, y su alto consumo de oxígeno. Junto con ello, el aporte abundante de metales de transición que se produce en el cerebro hace que sea un objetivo ideal para el ataque por parte de los radicales libres.

Muchos estudios han demostrado que el hipocampo es una de las regiones del cerebro más vulnerables a elementos dañinos, entre ellos el estrés prolongado. Esto tiene como consecuencia la acumulación excesiva del neurotransmisor glutamato en las sinapsis que, mediante la activación de los receptores NMDA, pone en marcha una cascada de reacciones intracelulares que conducen finalmente a procesos degenerativos en las neuronas (Pivovarova y Andrews 2010). El glutamato, el neurotransmisor excitador más importante en el SNC, es una potente excitotoxina capaz de producir neurotoxicidad y hasta la muerte neuronal (Choi 1988). Estos daños inducidos por

glutamato contribuyen a formar la base patológica de diferentes desórdenes neurológicos.

Un modelo muy utilizado para desencadenar un proceso de excitotoxicidad es la isquemia. Una condición de isquemia puede venir provocada por un fallo cardiaco (isquemia global), o bien por un trauma o un bloqueo de determinados vasos sanguíneos del cerebro (isquemia focal). En estas condiciones el O₂ no puede llegar a las células del sistema nervioso y, sin oxígeno, la cadena de transporte de electrones de la mitocondria pierde su aceptor final, de forma que se pierde la capacidad de síntesis de ATP por parte de estas células (Alberdi y cols., 2005). Sin ATP, los mecanismos que dependen de él para su funcionamiento, y que están relacionados con el transporte hacia el medio extracelular de Na⁺ y Ca²⁺, y la recaptación de K⁺, no pueden funcionar correctamente (por ejemplo la ATPasa del retículo endoplásmico –SERCA-, la ATPasa de la membrana plasmática o la bomba de Na⁺/K⁺). Debido a los altos niveles de K⁺ en el exterior celular, el transporte de agua al interior celular se reduce, provocando un edema local (Nedergaard y cols., 2010). Los transportadores de glutamato de los astrocitos operan de manera que transportan 3 iones de Na⁺ al interior de la célula y un ion de K⁺ fuera por cada molécula de glutamato que es internalizada. Debido a la pérdida del ATP, y a los altos niveles intracelulares de Na⁺ y extracelulares de K⁺, la recaptación de glutamato se ve seriamente comprometida (Bambrick y cols., 2004).

En estas condiciones la membrana de la neurona se despolariza conduciendo a la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Además, los canales NMDA pueden liberarse del magnesio que los mantiene bloqueados y, junto con el glutamato presente en ese momento, dejan pasar el ion Ca²⁺; eso conduce a que el Ca²⁺ se acumule en la neurona presináptica y dirija la secreción vesicular de glutamato hacia la postsináptica. La cantidad de glutamato liberada de esta forma se va multiplicando como una reacción en cadena. A través de los canales NMDA, el glutamato hace que la membrana de la neurona postsináptica aumente su permeabilidad para Ca²⁺ (Bano y Nicotera 2007).

La contribución del ion Ca²⁺ es importante en condiciones fisiológicas para muchos procesos celulares, entre ellos, la secreción vesicular de neurotransmisores, necesarios para la comunicación intercelular; sin embargo, en condiciones de isquemia su acumulación en el citoplasma en concentraciones suprafisiológicas, desregula la

actividad celular normal. Un ejemplo de este tipo de alteración de la función celular es el caso de proteasas dependientes de Ca^{2+} , como las calpaínas, que conducen al daño celular por proteólisis descontrolada de los elementos del citoesqueleto y otros componentes de las células. Además, el Ca^{2+} activa a efectores que participan en el proceso de muerte celular, como es el caso de las caspasas, pudiendo dar lugar a fenómenos apoptóticos. También pueden tener lugar daños celulares mediados por el incremento de ERO generadas en la mitocondria por el exceso de Ca^{2+} (Yamashima 2004).

Posteriormente, en la fase de reperfusión, hay un aumento en la producción de especies oxidantes en las proximidades de los vasos sanguíneos, como por ejemplo anión superóxido, NO y peroxinitratos. Unas proteasas altamente potentes de la matriz mitocondrial, las metaloproteasas, se activan como consecuencia de los niveles tan altos que se alcanzan de radicales libres, y degradan el colágeno y la lámina basal. La degradación de estas proteínas estructurales destruye la integridad de la pared vascular y aumenta la permeabilidad de la BHE. La falta de un aporte de sustratos metabólicos adecuado a las neuronas de la zona afectada del cerebro, provoca un fracaso en el cumplimiento de funciones orgánicas complejas como el mantenimiento de la postura, el movimiento y el lenguaje. En esta situación, se activa la migración de la microglía y la infiltración de células inflamatorias periféricas, lo que resulta en una generación masiva y rápida de ERO en los vasos sanguíneos y leucocitos en el cerebro lesionado (Pradeep y cols., 2012). Así pues, se considera que el estrés oxidativo exacerbado debido a la afluencia masiva de los radicales libres generados en las zonas afectadas durante la fase de reperfusión, es la principal causa de la lesión cerebral en la isquemia (Ishii y cols., 2010).

El estrés oxidativo también subyace en lo que se ha denominado excitotoxicidad, un fenómeno que viene provocado por la pérdida de la homeostasis iónica y el exceso de glutamato liberado en condiciones de isquemia, que pueden alcanzar un nivel de hasta ocho veces superior a los observados en condiciones fisiológicas. Dado que las neuronas del hipocampo median sus procesos de señalización intercelular principalmente a través de glutamato, esta zona es especialmente sensible a los daños neurológicos derivados de una isquemia/reperfusión.

2.10.5 Páncreas y estrés oxidativo

Estudios realizados en varios modelos experimentales sugieren que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de patologías pancreáticas. Las ERO están implicadas en la patogénesis de la pancreatitis tanto aguda como de la crónica (Sanfey y cols., 1986; Schoenberg y cols., 1994). Además se piensa que la pancreatitis parece ser un paso previo al desarrollo de procesos cancerosos en el páncreas, como por ejemplo el adenocarcinoma ductal (Hausmann y cols., 2014).

Entre las alteraciones fisiopatogénicas tempranas más importantes dentro de la célula acinar asociadas a la pancreatitis, cabe destacar la activación de los zimógenos dentro de la propia célula acinar. En condiciones normales, las células acinares secretan una gran cantidad de enzimas digestivas, las cuales se sintetizan en forma de precursores inactivos. Además, existen mecanismos adicionales de protección de la glándula tales como cambios de pH, proteínas inhibidoras de la activación (SPINK-1) y proteasas que degradan las enzimas que se hayan podido activar, evitando el daño celular.

Después de su síntesis en el RE, las proenzimas son procesadas en el AG y son almacenadas en vacuolas denominadas gránulos de zimógeno. En la patogenia de la pancreatitis experimental se ha demostrado un incremento en el contenido enzimático dentro de dichos gránulos (Manso y cols., 1999). En el proceso de secreción, como se ha mencionado anteriormente, un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} induce la fusión de los gránulos de zimógeno con la membrana apical de la célula acinar y desencadena la exocitosis enzimática.

La activación intracelular de las enzimas pancreáticas se iniciaría con la transformación de tripsinógeno en tripsina, la cual produciría la activación en cascada del resto de proteasas digestivas. En la activación prematura tanto de la tripsina como del resto de los enzimas digestivos en el interior de las células acinares podría jugar un papel importante una alteración de los niveles normales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Murphy y cols., 2008; Sutton y cols., 2008). Además, la distribución espacial y temporal del Ca^{2+} intracelular en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos ha sido relacionada directamente con el daño pancreático. Así, un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estaría implicado

Antecedentes bibliográficos

en los fenómenos inflamatorios y en la muerte celular (Gukovskaya y Gukovsky 2011), tanto por necrosis (Petersen y Sutton 2006) como por apoptosis (Yu y cols., 2003); (Miyasaka y cols., 1998).

En estudios *in vitro* se ha observado la activación de zimógenos y una posterior necrosis celular tras la estimulación de las células con concentraciones supramáximas de CCK (Grady y cols., 1998; Saluja y cols., 1999). El daño pancreático causado por la infusión de dosis supramáximas de ceruleína o de CCK produce elevaciones anormales de la $[Ca^{2+}]_i$; (Ward y cols., 1996) y la formación de ERO origen mitocondrial (Granados y cols., 2004); (Suzuki y cols., 1993) y estos fenómenos se han relacionado con la alteración en la liberación de enzimas digestivas (Gonzalez y cols., 2006b).

Por tanto, las variaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular juegan un papel crítico en desarrollo de estrés oxidativo en células acinares pancreáticas, siendo un factor relevante en el desarrollo de la pancreatitis. En la liberación anormal de Ca^{2+} al espacio citoplasmático pueden participar, además del RE, los compartimentos ácidos que se encuentran en la zona apical (Petersen y cols., 2011).

En la regulación de la secreción enzimática también intervienen modificaciones en las proteínas de la membrana de los gránulos de zimógeno, tales como glicoproteínas, mucina o sincolina, las proteínas de la familia SNARE,... que intervienen en la fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática; también tiene un papel fundamental la reorganización de los filamentos de actina. Trastornos en los procesos que regulan la fisiología del citoesqueleto podrían contribuir a los desórdenes propios de los procesos secretores e inflamatorios de la glándula (Cosen-Binker y cols., 2008; Rosado y cols., 2002; Williams 2010).

Por otra parte, dentro de la célula acinar también se activan de rutas de señalización y factores de transcripción que promueven la expresión de moléculas proinflamatorias. Dosis supramáximas de CCK estimulan la cascada de las MAPKs y conducen a la activación de proteínas cinasas proinflamatorias intracelulares. Al mismo tiempo, se activan factores de transcripción proinflamatorios como el NFKappaB (Chan y Leung 2011; Dabrowski y cols., 1996; Samuel y cols., 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, debido a su acción sobre los lípidos de membrana, las proteínas celulares y los ácidos nucleicos (ADN, ARN), las ERO han sido asociadas con numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer (Ames y cols., 1993). Se ha estudiado cómo la pancreatitis aguda progresa a pancreatitis crónica, y cómo la activación de distintas rutas de señalización mediadas por el estrés oxidativo, induce la aparición de células cancerígenas. El daño recurrente en el páncreas conlleva un aumento de dicho estrés oxidativo, que disminuye los mecanismos de protección y activa los mecanismos inflamatorios. Esta inflamación crónica origina tres tipos de lesiones precancerosas: la neoplasia pancreática intraepitelial, los tumores mucinosos papilares intraductales y las neoplasias quísticas mucinosas; la evolución posterior de estas lesiones precursoras y el aumento de los procesos de fibrosis en el páncreas da lugar al adenocarcinoma pancreático de células ductulares (Yonezawa y cols., 2008).

En dicha evolución, cabe destacar la participación de las células estrelladas del páncreas, que son activadas por citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1, IL-6, y activina A. Se le ha atribuido a estas células un papel regulador en la citoarquitectura y fisiología del páncreas, llegando a ser células secretoras y reguladores de la secreción de las células acinares pancreáticas en respuesta a CCK (Phillips y cols., 2010). También se ha sugerido que las células estrelladas interactúan con células cancerígenas y promueven la progresión del cáncer mediante mecanismos que implican una elevada proliferación celular, la migración y la consiguiente metástasis (Mantoni y cols., 2011).

Finalmente, la activación de proteínas oncogénicas como KRAS, o la pérdida de genes supresores de tumores tales como p16 o p53 pueden permitir la transformación de células normales en cancerosas en el páncreas exocrino (Kolodecik y cols., 2013)

2.10.6 Mecanismos fisiológicos de detoxificación de ERO en astrocitos

En general, todas las células del organismo están sometidas a estrés oxidativo. Los astrocitos constituyen un intermediario entre la sangre y las neuronas, y las evidencias experimentales indican que estas células poseen una amplia capacidad de detoxificación y eliminación de xenobióticos, así como la posibilidad de sustentar, en parte, las capacidades de detoxificación de las propias neuronas.

Antecedentes bibliográficos

Los astrocitos expresan las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Esta última se encarga de transformar el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) en H_2O_2 y O_2 . La catalasa transforma el H_2O_2 en H_2O y O_2 , y se encuentra en los microperoxisomas. Ambas vías son de importancia capital para la viabilidad de la célula, pues la formación de estos radicales tiene lugar durante procesos fisiológicos como por ejemplo la respiración celular. En mamíferos, se han descubierto tres isoformas de la SOD: manganeso superóxido dismutasa (MnSOD o SOD2), localizada en la matriz mitocondrial; la cobre-zinc SOD (CuZnSOD o SOD1) en el espacio intermembrana de la mitocondria, peroxisomas, núcleo y citosol; y la SOD extracelular (EcSOD o SOD3) anclada en la superficie de la membrana celular. Otras enzimas con actividad peroxidasa ampliamente distribuidas en el organismo son la glutatión peroxidasa, una selenoproteína, y las peroxirredoxinas, enzimas ubicuas en el organismo, con grupos tioles (Navarro-Yepes y cols., 2014).

Además, si no se retiran, oxidantes como el H_2O_2 pueden dar lugar, en presencia de Fe^{3+} y a través de la reacción de Fenton, a los altamente reactivos radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). El ($O_2^{\cdot -}$) puede reaccionar con óxido nítrico (NO) para dar lugar a ion peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), responsable de muchos daños celulares en neuronas que emplean el NO como señalizador, como es el caso de la región CA1 de hipocampo (Turrens 2003).

El glutatión es el quizás el sistema más importante de detoxificación de las ERO del que disponen los astrocitos. Es un tripéptido, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, y su síntesis que se promueve a través de la activación de un factor de transcripción, el NRF2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2*), que regula la expresión de las enzimas que lo sintetizan. El sistema glutatión está constituido por dos miembros, la forma reducida o GSH y la forma oxidada o GSSG. El GSH actúa de pantalla entre las ERO y las posibles dianas celulares de los oxidantes, evitando los daños. Su acción protectora se produce gracias a que posee en su estructura grupos tiol (-SH), mientras que el enlace γ -glutamilo entre el glutámico y la cisteína le hace resistente a la degradación por la mayoría de peptidasas celulares (Aquilano y cols., 2014).

Hay dos enzimas que participan en la síntesis de GSH: la glutamato cisteína ligasa (GCL), también denominada γ -glutamilcisteína sintetasa, y la glutatión sintetasa (GS), que en dos reacciones consecutivas sintetizan el dipéptido γ GC y le unen glicina,

respectivamente. El glutatión se oxida al entrar en contacto con los peróxidos dando lugar a un enlace tioéster entre dos moléculas de la forma reducida. La enzima glutatión reductasa (figura 15), que emplea como donador el NADPH, procedente de la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato, transforma el GSSG en GSH (Dringen 2000).

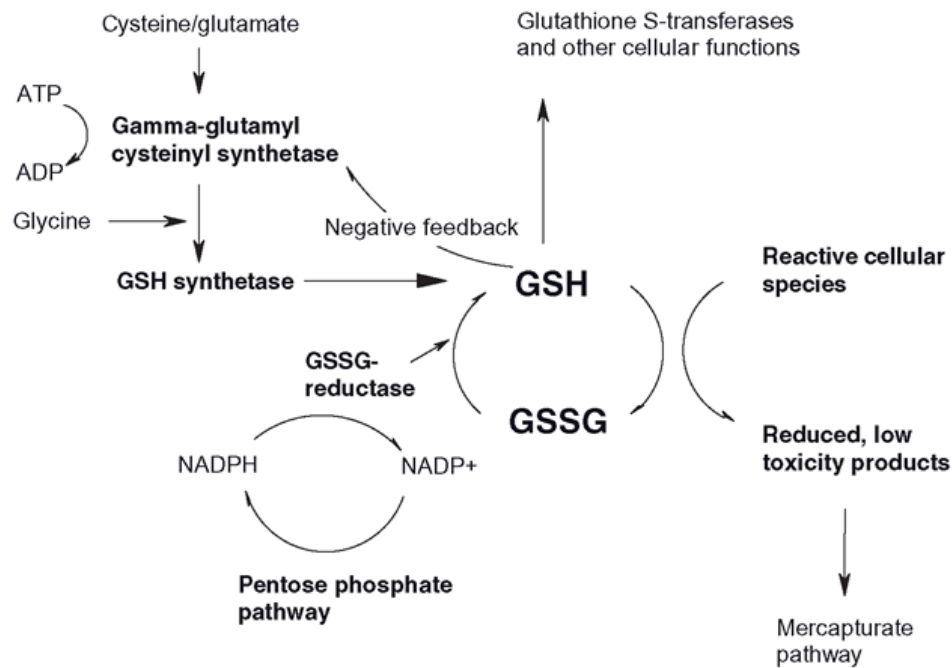


Figura 15. Descripción esquemática de los sistemas que intervienen en la regeneración de GSH.

Es sabido que en condiciones de estrés oxidativo tiene lugar una liberación de GSH por parte de astrocitos hacia el medio extracelular, para que pueda ser captado por las neuronas. Una vez allí, tiene lugar la conversión del GSH en un dipéptido cisteína-glicina (Cys-Gly) por parte de una enzima situada en la membrana del astrocito, la γ -glutamyl transpeptidasa. El siguiente paso es la ruptura de este dipéptido en cisteína y glicina por parte de una aminopeptidasa presente en la membrana de las neuronas. Acto seguido la cisteína es introducida al interior de la neurona por el transportador de aminoácidos neutros, y de esta forma sirve de base para la síntesis de glutatión dentro de la neurona (Dringen y cols., 2000; Eysseric y cols., 2000).

También son sustrato de la γ -GT los GSH-conjugados producidos por la reacción catalizada por las glutatión transferasas.

La presencia de ERO y otros xenobióticos, incrementa los niveles de NRF2 rápidamente, translocándose al núcleo de las células afectadas donde activa una batería de genes citoprotectores. NRF2 induce la expresión de un grupo de enzimas citoprotectoras, antixenobióticas y antioxidantes que incluyen hemo oxigenasa-1, quinona oxidorreductasa y las enzimas del metabolismo del GSH, tales como γ -glutamylcisteína sintetasa (Cuadrado y cols., 2009).

Las glutarredoxinas son otro grupo de enzimas presentes en los astrocitos, y catalizan la reducción de H_2O_2 y otros peróxidos orgánicos, junto con la tiorredoxina (TRx). Son enzimas antioxidantes que en mamíferos forman parte de los sistemas “NADPH/GSSG reductasa/GSH/GTx” y “NADPH/TRx reductasa/TRx” respectivamente. Las TRx catalizan la reducción reversible de uniones disulfuro de proteínas. La reacción redox se lleva a cabo gracias a la presencia de dos cisteínas en su sitio activo, que son regeneradas por la TrxR y NADPH. El descenso de la actividad antioxidantes de estas enzimas es muy importante en el desarrollo de muchas patologías como el Alzheimer (Akterin y cols., 2006). Además, estas proteínas, junto con las peroxirredoxinas, están implicada en rutas de señalización y activación de otras proteínas como las MAPKs o la caspasa-3 (Hanschmann y cols., 2013).

Por último, cabe destacar el papel de la vitamina E (α -tocoferol), cuya concentración es 2,5 veces más elevada en astrocitos que en neuronas; presenta un efecto protector de la cadena respiratoria frente al estrés oxidativo y ante procesos de peroxidación lipídica, puesto que se trata de un importante antioxidante liposoluble (Makar y cols., 1994).

2.10.7 Mecanismos fisiológicos de detoxificación de ERO en el páncreas exocrino

En el páncreas exocrino, la principal defensa contra los radicales libres es llevada a cabo por un sistema enzimático que está constituido fundamentalmente por tres enzimas: la familia SOD, la catalasa y la familia glutatión peroxidasa.

En el páncreas, también cabe destacar la importancia del GSH. Este órgano posee una gran concentración de GSH (2 $\mu\text{mol/g}$ tejido y con un *turnover* rápido) y contiene en niveles significativos varias de las enzimas implicadas en el metabolismo de GSH. El páncreas parece obtener gran parte de la cisteína que se requiere tanto para GSH y la síntesis de estas enzimas, por hidrólisis del GSH plasmático en sus aminoácidos constituyentes y posteriormente, transportando dicha cisteína al interior. Esta hidrólisis se lleva a cabo por la 7-glutamil transferasa y la aminopeptidasa N, ambas presentes en el páncreas. La abundancia de los aminoácidos precursores favorece la formación de GSH (Githens 1991). El páncreas también contiene niveles significativos de proteína disulfuro isomerasa, glutatión peroxidasa y glutatión oxidoreductasa. La proteína disulfuro isomerasa, utiliza el glutatión oxidado, generado por la glutatión peroxidasa. Por el contrario, páncreas exocrino presenta una actividad relativamente baja de la γGCL ; en compensación, el páncreas presenta una actividad GT elevada (Leung y Chan 2009).

Por otro lado, la glutarredoxina también participa en el control redox de las células pancreáticas, mediando la glutationilación de proteínas, como por ejemplo, la ribonucleasa pancreática. También se encuentran en el páncreas peroxirredoxinas, concretamente la Prx2, Prx4, y Prx6 (Hanschmann y cols., 2013).

Pero también podemos encontrar en cantidades considerables en el páncreas otros antioxidantes tales como la vitamina C, la vitamina E y la vitamina A (Leung y Chan 2009).

Distintos estudios realizados en diferentes modelos de pancreatitis aguda y crónica, han mostrado que los niveles de enzimas como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la SOD disminuyen en el páncreas, produciéndose un desequilibrio redox. Además las actividades GPx y tiorredoxina (TRx) se han considerado como marcadores

de severidad de pancreatitis aguda (Leung y Chan 2009; Rahman y cols., 2004).

2.11 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que pueden retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Actúan interfiriendo con los radicales libres e inhibiendo las reacciones de oxidación, protegiendo así a las células de los efectos de los radicales libres.

Además de los antioxidantes endógenos, en la naturaleza existe una gran variedad de sustancias con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos se adquieren principalmente en la dieta. Los podemos clasificar en los siguientes grupos: vitaminas (A,C,E, carotenos), minerales (selenio, zinc, manganeso y magnesio), y otros grupos en los que podríamos incluir compuestos como la coenzima Q-10, flavonoides, antocianinas, indoles/ tioles, isoflavonas, catequinas, lignanos (Flora 2009).

Dentro de las baterías antioxidantes que se pueden encontrar en el organismo, podemos mencionar los carotenoides, que están ampliamente distribuidos, y son los más abundantes en el plasma humano; podríamos citar por ejemplo el β -caroteno, el α -caroteno, la luteína, la zeaxantina, el licopeno y la criptoxantina.

Los flavonoides pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales, en seis clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y proantocianinas. Estos compuestos se han utilizado en diversos modelos animales, cultivos celulares y estudios enzimáticos en los que se ha confirmado su capacidad antioxidante (Dias y cols., 2005; Moreira y cols., 2004), además de mostrar la capacidad de inhibir eventos carcinogénicos (Hoensch y Kirch 2005).

La acción del antioxidante es el sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de las moléculas funcionalmente vitales o más importantes para la célula. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Los antioxidantes exógenos pueden actuar como moléculas que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.

En relación con el estrés oxidativo y sus consecuencias, diversos estudios han señalado a los antioxidantes como agentes moduladores en los procesos de apoptosis, y en la diferenciación y proliferación celular. Asimismo, estas sustancias pueden presentar un doble modo de acción, induciendo la muerte en células malignas pero protegiendo las células sanas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las acciones que presentan dependen de las concentraciones utilizadas.

Los antioxidantes, ya sean naturales o no, presentan interesantes acciones sobre la fisiología celular. Así, la aportación de flavonoides en la dieta se ha relacionado con la mejora en la actividad cognitiva (Letenneur y cols., 2007), el déficit motor o la memoria espacial durante el envejecimiento (Spencer 2008). Los polifenoles magniferina y morina, tienen claros efectos neuroprotectores (Campos-Esparza Mdel y Torres-Ramos 2010), y la curcumina antitumorales (Purkayastha y cols., 2009). Componentes fenólicos derivados del aceite de oliva tienen efectos neuroprotectores contra la isquemia cerebral, la enfermedad de Huntington, el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple (Khalatbary 2013). La cinamtanina B-1, ha mostrado tener un efecto protector de la función pancreática exocrina (Gonzalez y cols., 2012; Rivera-Barreno y cols., 2010), y astrocítica (Santofimia-Castano y cols., 2011). Y el resveratrol tiene efectos beneficiosos en la neuropatía diabética (Sharma y cols., 2009) y presenta efectos protectores en células gliales y neuronas (Lu y cols., 2010). Asimismo, en células acinares pancreáticas, el licopeno previene la depleción de proteínas reparadoras de la doble hélice de ADN inducida por el estrés oxidativo (Seo y cols., 2009).

Por otro lado, dependiendo de la concentración y la interacción con otras moléculas, los antioxidantes pueden tener efectos perjudiciales para las células. Este es el caso de la quercetina, que es capaz de activar la apoptosis (Russo y cols., 1999). Otro antioxidante, el ditioeritritol, modifica las propiedades de permeabilidad en canales iónicos por lo que puede moverse el ion Ca^{2+} , produciéndose aumentos en su concentración citosólica en células obtenidas de ganglios espinales de rata (Fedorenko 2006). También se ha visto que antioxidantes como los flavonoides, inhiben enzimas antioxidantes como la catalasa (Krych y cols., 2014). Un estudio en hígado de rata perfundido, demuestra que flavonoides como la hesperidina, hesperetina y narengina o también la fisetina actúan como prooxidantes, induciendo cambios en el metabolismo

mitocondrial, activando el ciclo del ácido cítrico, reduciendo el consumo de oxígeno y la cetogénesis (Constantin y cols., 2011; Constantin y cols., 2013). Por otro lado, se han realizado numerosas investigaciones destacando el efecto prooxidante de moléculas antioxidantes como el resveratrol, el ácido cafeínico, el ácido ascórbico o el α -tocoferol; en presencia de metales de transición, como el cobre o el hierro, promoviendo la reacción de *Haber-Weiss* (Ahmad y cols., 2005; Bhat y cols., 2007; Fukuhara y cols., 2006; Marczewska y cols., 2000; Yamashita y cols., 1998).

Finalmente, es interesante destacar las propiedades antitumorales de los antioxidantes. Por ejemplo, la hesperetina induce la muerte en células de adenocarcinoma de colon (Sivagami y cols., 2012). El resveratrol induce la muerte en células tumorales de glioma (Zhang y cols., 2007) y de las células AR42J (Garcia-Sanchez y cols., 2012), y es capaz de aumentar el efecto citotóxico del 5- fluorouracilo, potenciando su efecto oxidativo en células humanas de cáncer de colon (Santandreu y cols., 2011). Otro flavonoide, la nobiletina, presenta efectos antiproliferativos y proapoptóticos en células de cáncer de mama (Chen y cols., 2014). Asimismo, la quercetina induce la inhibición de la topoisomerasa II y el ciclo celular en células de carcinoma de hígado (Sudan y Rupasinghe 2014). Por otra parte, la melatonina también induce la muerte en células tumorales (Sanchez-Sanchez y cols., 2011); (Gonzalez y cols., 2011).

Con todo ello, el destino de la célula dependerá de la habilidad de los antioxidantes para inducir un entorno antioxidante, relacionado con un efecto protector, o un entorno prooxidante, relacionado con un efecto citotóxico. Finalmente, y en relación con esto último, la disponibilidad de defensas antioxidantes es esencial para la supervivencia celular, jugando un papel destacado en el estado de oxidación-reducción (redox) de los grupos tioles (Amorati y cols., 2013).

2.11.1 Ebselén

El ebselén (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3 (2H) ona) es un compuesto de selenorgánico y químicamente electrófilo (figura 16). El mecanismo general de acción del ebselén se basa en su reacción con los grupos tioles de residuos de cisteína

específicos en las proteínas celulares. Este compuesto cataliza la reducción de las ERO de una manera similar a la enzima glutatión peroxidasa. Opera por un mecanismo de tres etapas que implica cambios en el estado de oxidación del residuo (SeCys) del sitio activo. Las ERO oxidan al selenol (EBS-SeH) para formar ácido selénico (EBS-SeOH), que a su vez es reducido por el GSH dando lugar a selenil sulfuro (EBS-SeSG) (Antony y Bayse 2011). El ebselén también reacciona con el sistema tiorredoxina, ya que es un sustrato excelente para la enzima tiorredoxina reductasa; actúa así de forma eficiente como un oxidante de la tiorredoxina reducida, y cataliza la reducción del H_2O_2 (Zhao y cols., 2002). De la misma manera, el ebselén se comporta como un mimético de la enzima dehidroascorbato reductasa (Zhao y Holmgren 2004).

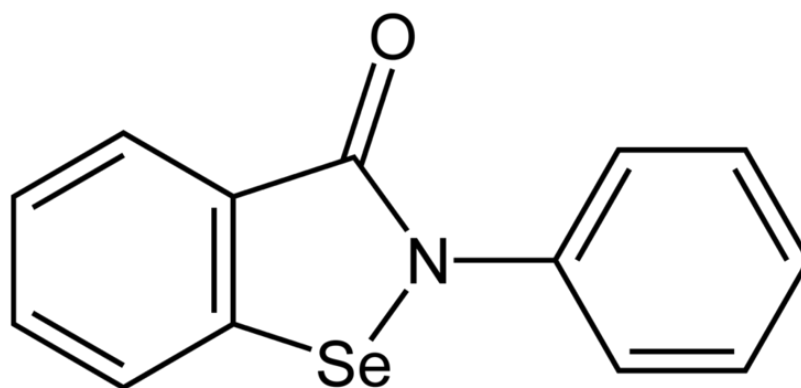


Figura 16. Estructura química del ebselén.

El ebselén es una molécula con rápida absorción vía oral y permeable a la barrera hematoencefálica. Experimentalmente, el ebselén se transporta en el torrente sanguíneo unido a la albúmina, enlazado a sus residuos de cisteína (Christison y cols., 1994). Determinar los movimientos intracelulares del ebselén es complejo, ya que no es una molécula fluorescente. Sin embargo, el selenio es un elemento traza en los medios empleados en los cultivos celulares, por lo que el análisis de la concentración y distribución de selenio en las células tratadas con ebselén podría ser una fuente importante de información. Basándose en esta metodología, se ha determinado que el ebselén o sus metabolitos se localizan principalmente en el RE (Aitken y cols., 2012).

Antecedentes bibliográficos

Además, varios estudios demuestran que la mitocondria es otro orgánulo diana para el ebselén, actuando en la cadena de transporte de electrones (Nagi y cols., 1989). Por tanto, se cree que tanto el RE como la mitocondria son los principales orgánulos en los que radica la actividad farmacológica del ebselén.

Teniendo en cuenta los resultados que proporcionan los estudios publicados, el ebselén tiene como objetivo de sus acciones una amplia variedad de proteínas y moléculas celulares, modulando así diferentes procesos celulares. Por medio de sus acciones el ebselén puede inducir efectos beneficiosos o dañinos en los sistemas biológicos.

El ebselén reacciona con los grupos tioles de los aminoácidos, formándose enlaces estables entre el selenio y el azufre. Además, este antioxidante parece actuar sobre múltiples vías y su modo de acción en las células es pleiotrópica. La reactividad del ebselén con los tioles proteicos le convierte en un potente modulador de la función de proteínas que contienen residuos de cisteína. Por ejemplo, se ha demostrado que esta molécula inhibe una serie de enzimas implicadas en diversos procesos biológicos, tales como lipoxigenasas (Walther y cols., 1999), óxido nítrico sintasas (Hattori y cols., 1996), NADPH oxidasas (Smith y cols., 2012), peroxidasa (Mishra y cols., 2006), glutamato deshidrogenasa (Azad y cols., 2014), lactato deshidrogenasa (Lugokenski y cols., 2011), etc.

Se ha mostrado también que el ebselén afecta a la homeostasis del ion Ca^{2+} . Así, en microsomas de plaquetas se ha observado una inhibición de la activación de receptores de IP_3 en presencia de este compuesto seleno-orgánico. Esta inhibición desaparece a concentraciones mayores de 5 μM , provocando un aumento de la liberación de Ca^{2+} por parte de estos microsomas (Brune y cols., 1991). El ebselén también incrementa la movilización de Ca^{2+} en astrocitos de hipocampo de rata (Salazar y cols., 2008a) y degrada la función mitocondrial liberando Ca^{2+} desde este orgánulo (Gogvadze y cols., 2000). La función mitocondria se ve influida por el ebselén, ya que induce una disminución del potencial de membrana mitocondrial con la posterior liberación de citocromo c (Azad y Tomar 2014; Yang y cols., 2000b).

Entre los efectos que se han publicado del ebselén podemos mencionar que previene la apoptosis inducida por fenómenos isquémicos, reduciendo el estrés

oxidativo asociado con la isquemia y la posterior reperfusión (Koizumi y cols., 2011). También reduce el grado de estrés oxidativo y peroxidación lipídica en modelos de estrés oxidativo que causan daño en la médula espinal (Kalayci y cols., 2005) o en lesiones traumáticas cerebrales, inhibiendo la fosforilación de p38 y reduciendo los niveles de NO (Wei y cols., 2014). Otros estudios han mostrado que el tratamiento con ebselén reduce la activación de p38, JNK o la liberación de citocromo c (Yoshizumi y cols., 2004). Adicionalmente, el ebselén es capaz de reducir el estrés oxidativo provocado por la excitotoxicidad del glutamato (Azad y Tomar 2014; Nogueira y cols., 2002).

El ebselén también muestra un efecto protector contra la apoptosis inducida por radiaciones ionizantes, reduciendo los niveles de peróxidos, disminuyendo los procesos proapoptóticos, como la activación de caspasas, e incrementando los niveles de moléculas antiapoptóticas (Tak y Park 2009). Además, el ebselén se ha propuesto como un tratamiento alternativo al litio en desordenes de bipolaridad, ya que tiene la capacidad de inhibir la inositol monofosfatasa (Singh y cols., 2013).

Asimismo, el ebselén confiere protección celular frente a los daños inducidos en el ADN por estados de estrés oxidativo, como muestran los resultados obtenidos en células HepG2, HL-60 o V79 incubadas sometidos a los efectos del H₂O₂ (Li y cols., 2000; Miorelli y cols., 2008; Yang y cols., 1999). En estudios *in vivo* en ratones el ebselén redujo el daño oxidativo inducido por ciclofosfamida, un agente quimioterápico (Tripathi y Jena 2008).

No obstante, y contrariamente a sus efectos beneficiosos, el ebselén también puede causar toxicidad celular. Por ejemplo, el ebselén induce apoptosis en células HepG2. En este efecto parece estar involucrada la rápida depleción de tioles intracelulares inducida por el ebselén (Yang y cols., 2000a). Se han descrito procesos de necrosis inducidos por el ebselén en células Sp2/0-Ag14, efecto que se reducía si las células eran incubadas en presencia de compuestos ricos en tioles. Contrariamente, el ebselén mostraba un efecto protector cuando las células se preincubaban con cicloheximinida, un compuesto que inhibe la síntesis proteica y que produce daños en el ADN (Guerin y Gauthier 2003). El ebselén también actúa como un agente genotóxico, efecto observado a altas concentraciones del compuesto, induciendo daños en el ADN

(Miorelli y cols., 2008), disminuyendo la tasa de crecimiento celular (Balkrishna y cols., 2014) o reduciendo la expresión de proteínas reparadoras de ADN (Azad y Tomar 2014; Zhao y cols., 2001).

También se le atribuyen a este antioxidante propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antiparasitarias, por ejemplo contra *P. falciparum* (Huther y cols., 1989), *Candida albicans* (Billack y cols., 2009) o *Mycobacterium tuberculosis* (Favrot y cols., 2013).

2.11.2 Melatonina

La N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) es una indolamina descrita por primera vez por McCord y Allen (1917), y aislada por Lerner y cols. en 1958 a partir de extractos de glándula pineal. La síntesis y liberación de la melatonina sigue un patrón circadiano con niveles circulantes más elevados durante la fase oscura del fotoperiodo y mínimos durante la fase luminosa, de tal forma que mantiene informado al individuo de las variaciones luz/oscuridad (Vandewalle y cols., 2009). Esta neuro-hormona ha sido estudiada en profundidad para determinar sus funciones exactas, y su posible empleo en farmacia. Uno de los usos de la melatonina es el de ajustar los ciclos de sueño/vigilia en personas cuyo horario de trabajo cambia o que sufren el denominado “jet lag”. La melatonina también se usa para el tratamiento de la incapacidad para conciliar el sueño (insomnio), para el síndrome de la fase retrasada de sueño y para el insomnio asociado con el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Trivedi y Kumar 2014). Más allá de esta utilidad, el interés “*medicinal*” puesto en esta hormona radica en que se ha demostrado que, en determinadas situaciones, la melatonina es capaz de paliar los daños inducidos por las ERO sobre los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. A partir de estas observaciones se ha sugerido que la melatonina sería eficaz para combatir los síndromes asociados a la acumulación de radicales libres, lo que ha dado pie a al estudio de su posible papel terapéutico en multitud de situaciones fisiopatológicas, además de su mero uso en el tratamiento de la alteración del sueño.

2.11.2.1 Biosíntesis de melatonina

La melatonina es una molécula con una antigüedad propuesta de al menos dos mil millones de años (Poeggeler y cols., 1994). Está presente en animales, bacterias y plantas, con la misma estructura molecular, situación que muy rara vez sucede en la naturaleza (Reiter y cols., 2007). La estructura indólica de la melatonina la hace una molécula bastante liposoluble, que atraviesa fácilmente por difusión simple la bicapa lipídica de la membrana. La melatonina es transportada en el plasma, parte unida a la albúmina (70%) y parte en forma libre (30%). La vida media de la melatonina en el plasma oscila entre 20 y 40 minutos (Boutin y cols., 2005).

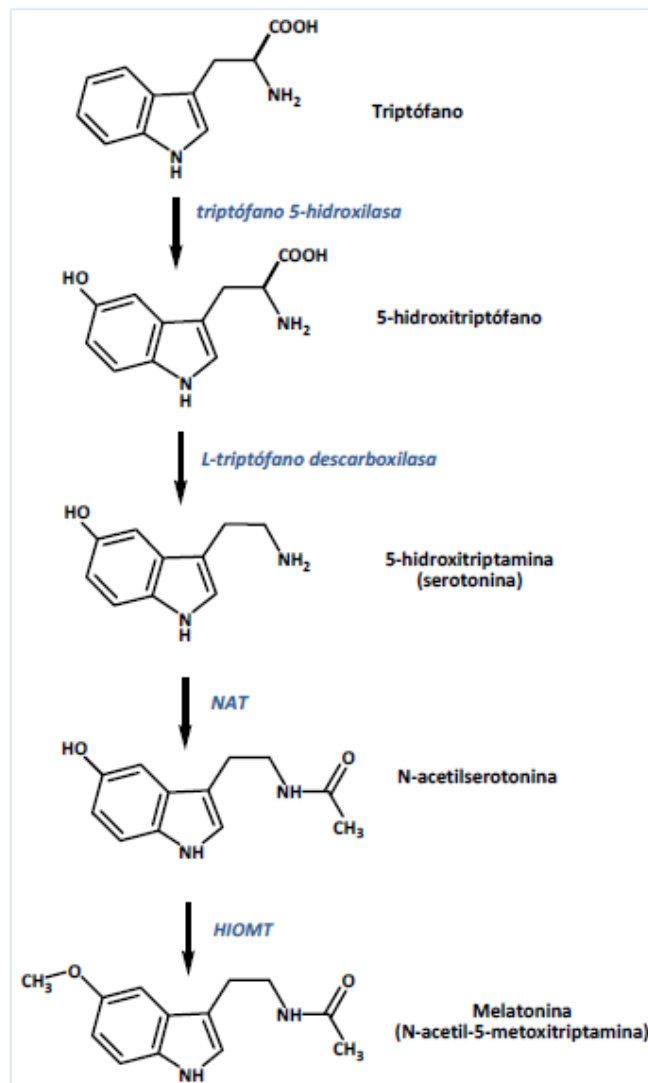


Figura 17. Biosíntesis de la melatonina.

Antecedentes bibliográficos

La biosíntesis de melatonina se produce a partir del triptófano (figura 17), un aminoácido aromático esencial. Este proceso tiene lugar en la glándula pineal principalmente, pero también se ha detectado en otros tejidos como la retina (Grace y cols., 1991), el cuerpo ciliado del iris (Aimoto y cols., 1985), la glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), la médula ósea (Tan y cols., 1999), el aparato digestivo (Bubenik 1980), el ovario (Itoh y cols., 1997), el timo (Naranjo y cols., 2007), el sistema inmune (Guerrero y Reiter 2002), el sistema portal hepático (Huether y cols., 1992) así como en el tracto urogenital, el tiroides o el placenta (Huether 1993). La concentración de melatonina determinada en el plasma está en el rango de picomolar. Sin embargo, dada su producción extrapineal, se ha sugerido que los niveles de melatonina en estos otros tejidos son cientos de órdenes de magnitud mayores que los del plasma (Reiter y Tan 2003). Es de especial relevancia la producción de melatonina en las células enterocromafines del intestino, habiéndose estimado que la cantidad de melatonina normalizada por gramo de tejido es 400 veces superior a la existente en la glándula pineal (Haimov y cols., 1995).

El triptófano entra en el pinealocito desde los capilares sanguíneos a través de un transporte activo bajo control adrenérgico, y sufre una hidroxilación en posición 5 por acción de la triptófano-5-hidroxilasa, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano (Sitaram y Lees 1978). Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano se descarboxila mediante la L-triptófano descarboxilasa para formar 5-hidroxitriptamina o serotonina, siendo ésta un importante neurotransmisor del sistema nervioso central. La L-triptófano descarboxilasa está localizada en el citosol del pinealocito y de otras estirpes celulares. Su actividad está regulada por la iluminación ambiental (Reiter 1991). La serotonina tiene dos vías principales de metabolización en la glándula pineal. Puede desaminarse por acción de la monoamino oxidasa, o convertirse en melatonina por la acción de dos enzimas que actúan sucesivamente: en primer lugar la N-acetil-transferasa, dando así lugar a la N-acetil-serotonina y a continuación la enzima hidroxindol-O-metil transferasa va a transferir a la N-acetil-serotonina un grupo metilo y convertirla en N-acetil-5-metoxi-triptamina, melatonina.

Se ha demostrado la presencia de la expresión de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de melatonina (NAT y HIOMT) en prácticamente todos los

tejidos del organismo (Stefulj y cols., 2001); por lo que se considera estos tejidos podrían no depender de la melatonina de origen pineal circulante en el plasma.

2.11.2.2 *Mecanismos de acción*

Tras considerar a la melatonina como una hormona, se intentaron explicar sus funciones, principalmente las relacionadas con el control de los biorritmos y la reproducción, a través de su interacción con receptores de membrana. Sin embargo, estudios posteriores han descrito funciones de la melatonina que no están relacionados con estos fenómenos. Esquemáticamente, los mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos: aquéllos que están mediados por su unión a un receptor, ya sea de membrana o nuclear; y aquéllos que se realizan de forma independiente de receptor, como la interacción con proteínas intracelulares.

-Receptores de membrana: Funcionalmente podemos hablar de dos tipos de receptores: de alta afinidad, que incluyen a los subtipos MT1 y MT2; y receptores citoplasmáticos de baja afinidad, con afinidad de 1-10 nM, MT3 (Dubocovich y cols., 2003). Recientemente se ha postulado que MT3 no es un receptor y que se trata en realidad de la enzima quinona reductasa II (Slominski y cols., 2012). Los receptores MT1 y MT2, son receptores de membrana acoplados a proteínas G inhibitoras y ejercen su acción principalmente mediante la inhibición de la adenilatociclasa, reduciendo de este modo los niveles de AMPc y activando la PLC (Dubocovich y Markowska 2005).

-Receptores nucleares: la melatonina tiene funciones en tejidos en los que no se ha descrito receptores de membrana, como el corazón y el tiroides (Buzzell y cols., 1989; Chen y cols., 1993). La existencia de receptores nucleares de melatonina se sugirió antes de su descubrimiento, cuando Withyachumnarnkul aisló melatonina en el núcleo celular, planteando que la melatonina podría actuar modificando la expresión génica en las células diana (Withyachumnarnkul y cols., 1986). Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Estas proteínas, cuando se unen a su ligando específico se activan, de forma que junto con factores de transcripción generales regulan la actividad de la ARN polimerasa II, necesaria para la expresión génica. Por, tanto, la melatonina puede mediar sus

acciones a través de la ROR/RZR (acrónimo del inglés *Retinoid Orphan Receptors/Retinoid Z Receptors*) (Smirnov 2001). Las subfamilias de receptores a los que, según algunos autores, se une la melatonina incluyen: RZR α , ROR α , ROR α 2 y RZR β (Becker-Andre y cols., 1994). La estructura de los receptores nucleares consisten en un dominio N-terminal, un dominio de unión de ADN que contiene un dedo de zinc doble, una región bisagra, y un dominio de unión a ligando incluido en el C-terminal (Jetten 2009; Smirnov 2001). Los grupos de receptores nucleares se distribuyen de acuerdo con su subtipo; RZR β se encuentra en los tejidos neuronales, y RZR α se ha localizado en el tejido adiposo, la piel, los testículos, el cartílago, y el hígado (Slominski y cols., 2012).

-Interacción con proteínas intracelulares: se ha descrito la unión de la melatonina con proteínas intracelulares, como calmodulina, calreticulina y PKC. La calmodulina es una proteína ubicua y multifuncional, cuya función principal es acomplejar iones Ca²⁺, lo que le permite modular la actividad de muchas enzimas y proteínas intracelulares. Cuando la melatonina interactúa con la calmodulina, inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma dependiente de la concentración, lo que permite modular directamente las señales intracelulares de Ca²⁺ (Luchetti y cols., 2010). Por otra parte, la unión de la melatonina a la calreticulina es altamente específica y se produce con una afinidad en el rango nanomolar (Macias y cols., 2003). Asimismo, la melatonina activa la PKC de forma dependiente de Ca²⁺ (Benitez-King y cols., 1996). Los resultados obtenidos de la interacción de melatonina con calmodulina, calreticulina y PKC, respaldan la idea de que la melatonina puede contribuir a modular la estructura del citoesqueleto. Además, como las tres proteínas son dependientes de Ca²⁺, es posible que otras proteínas con dominios de unión al Ca²⁺ también puedan estar influidas por la melatonina.

Otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria. Se postula que la proteína de unión se localiza en la rampa anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hardeland 2008). A concentraciones elevadas, se ha demostrado que la melatonina es capaz de inhibir la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (Andrabi y cols., 2004), un hecho que podría implicar un sitio de unión adicional, de baja afinidad.

La unión de la melatonina a los sitios de unión no mediados por receptor, propuestos previamente, permitiría explicar por qué la melatonina a pesar de ser capaz

de atravesar todas las membranas biológicas, no se libera en grandes cantidades al torrente circulatorio, sino que permanece en los tejidos a mayor concentración que en el plasma. Además el hecho de que se acumule en algunos tejidos, provoca la ausencia de ritmo circadiano de melatonina en éstos, ya que la mayor producción de radicales libres se produce en las fases de actividad neural y motora (Hardeland 2005).

2.11.2.3 Mecanismos y función antioxidante de la melatonina

Un mecanismo de acción de la melatonina, independiente de su interacción con receptores o con proteínas intracelulares, es su interacción con radicales libres. Esta acción ocurre en todos los compartimentos del organismo. En 1991, se realizó la primera observación de que la melatonina tiene propiedades antioxidantes (lanas y cols., 1991), y en 1993 se demostró que la melatonina neutraliza $\cdot\text{OH}^-$ (Tan y cols., 1993). A partir de ese momento, son miles los trabajos que demuestran la capacidad de la melatonina para interactuar con ERO, pero que también demuestran su habilidad para activar otros mecanismos antioxidantes, y por ello actuar como una molécula antioxidante.

Las características estructurales que le permiten actuar como un potente secuestrador de radicales libres son: el grupo metilo localizado en posición 5 del indol y el grupo acetilo, de tal forma que sin estos grupos su capacidad para neutralizar radicales libres merma e incluso se puede convertir en un compuesto pro-oxidante (Reiter y cols., 2002a).

La melatonina es una molécula rica en electrones, que cede un electrón al OH^- , formándose un radical indolil, que es menos reactivo que el OH^- (Tan y cols., 2000). Este radical puede reaccionar a su vez con un O_2^- para formar el producto final, N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK), que se elimina por orina. Otra posibilidad es que el indolil radical formado reaccione con otro $\cdot\text{OH}$ para producir la 3-hidroximelatonina cíclica, que se elimina por orina. Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como la AFMK, tienen funciones depuradoras de agentes tóxicos (Acuña-Castroviejo y cols., 2001). Asimismo, reacciona con el H_2O_2 produciendo AFMK. La melatonina reacciona directamente con el ONOO^- , y el resultado de esta reacción es la formación de 6-hidroximelatonina, derivado que también tiene propiedades

antioxidantes (Maharaj y cols., 2003). Finalmente, la melatonina puede reaccionar con el HClO para producir 2-hidroximelatonina y neutralizar el singlete de O₂ oxidándose a AFMK (de Almeida y cols., 2003). Esta propiedad conjunta de la melatonina y sus metabolitos han dado origen al término de la “cascada antioxidante de la melatonina” y hace de este compuesto uno de los más efectivos como neutralizador de especies reactivas de oxígeno, incluso a bajas concentraciones (Tan y cols., 2007).

Pero además, la melatonina puede promover la activación de las defensas antioxidantes endógenas por su efecto estimulador sobre la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa o la glutatión peroxidasa (Reiter y cols., 2002b; Rodriguez y cols., 2004). En primer lugar, estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GR, regulando así el balance GSSG/GSH (Barlow-Walden y cols., 1995; Martin y cols., 2000; Pablos y cols., 1995). Además, aumenta la producción de glutatión por la estimulación de la γ -glutamilcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutatión (Urata y cols., 1999). Así, la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD (Antolin y cols., 1996) y la catalasa (Coto-Montes y Hardeland 1999; Leon y cols., 2004).

Dado que la melatonina es tanto lipofílica como hidrofílica, puede realizar sus funciones antioxidantes con igual eficiencia en múltiples compartimentos subcelulares, es decir, en el núcleo (Vijayalaxmi y cols., 1995), en el citosol (Reiter y cols., 2010) y en las membranas. Pero también se ha descrito que la melatonina puede realizar sus funciones antioxidantes a nivel mitocondrial. Estos estudios tienen especial interés porque la mitocondria es la primera fuente de radicales libres en las células eucariotas, y además porque la melatonina es capaz de atravesar fácilmente la membrana mitocondrial y se acumula a elevadas concentraciones en dicha organela (Acuña-Castroviejo y cols., 2003). Entre las principales acciones de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial cabe incluir la estabilización de la membrana interna mitocondrial, el incremento de la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias hepáticas y cerebrales, la prevención de la formación de radicales libres por la mitocondria, el aumento de la producción de ATP mitocondrial, la estabilización de la membrana mitocondrial frente a las ERO y la prevención de la apoptosis modulando la funciones mitocondriales, incluyendo los

efectos en la homeostasis del Ca^{2+} y el potencial de membrana mitocondrial (Acuña Castroviejo y cols., 2011).

Otro efecto destacado que tiene la melatonina, y que ha despertado enormemente el interés de los científicos, es su efecto antiapoptótico en células inmunes o células nerviosas, por ejemplo, y su efecto proapoptótico en células tumorales (Miller y cols., 2006). De esta forma, la melatonina se comporta como un "asesino inteligente", es decir, la modulación de los procesos anti-apoptóticos en las células normales, y desencadenando señales pro-apoptóticas en las células del cáncer. Se ha sugerido que la melatonina puede ejercer sus efectos citoprotectores a través de diferentes vías dependientes de las MAPKs, como por ejemplo ERK1/2 (Luchetti y cols., 2010). La melatonina, inhibe la fragmentación de ADN, regula los niveles y actividad de tiorredoxinas y también impide la liberación del citocromo c desde la mitocondria (Fujino y cols., 2007; Luchetti y cols., 2010). De hecho, la melatonina puede inhibir la vía mitocondrial de la apoptosis, presumiblemente a través de la regulación de los niveles de la proteína proapoptótica Bax/ Bcl2 (Hoiyman y cols., 2004).

Por otro lado, la melatonina induce la muerte celular programada en una amplia gama de diferentes tumores (mama, gastrointestinal, hematológica, la próstata, el osteosarcoma, melanoma, riñón, etc.) y en líneas celulares tumorales como por ejemplo las células AR42J (del Castillo-Vaquero y cols., 2010). Este indol presenta dos efectos principales: inhibición de la proliferación celular y activación de la apoptosis. Aunque en determinados tipos de cáncer la melatonina puede producir ambos efectos, parece que de forma general que a concentraciones bajas (nanomolar), sólo podría ejercer una acción citostática; mientras que los efectos apoptóticos se observan a concentraciones más elevadas. El tipo de efecto y su potencia, sin embargo, depende en gran medida del tipo de célula y el tumor (Rodríguez y cols., 2013).

Por el momento se desconocen con exactitud los mecanismos de acción y vías moleculares implicadas en los procesos de pro-apoptóticos inducidos por la melatonina, y por ello son objeto actual de estudio. La melatonina puede ejercer sus acciones a través de sus receptores o bien directamente. Dentro de sus acciones, y de modo muy interesante, se ha demostrado que incluso en modelos de tumores que no responden a la melatonina sola, esta hormona puede amplificar significativamente los efectos

citostáticos y citotóxicos desencadenados por otros compuestos o fármacos convencionales (Korkmaz y cols., 2009; Uguz y cols., 2012).

Hay dos vías principales que pueden activar la apoptosis y ambas parecen estar implicadas en la muerte celular inducida por la melatonina: la vía extrínseca (puesta en marcha por receptores de muerte celular) o la vía intrínseca (de origen mitocondrial). La vía extrínseca es desencadenada por la unión de ligandos específicos de la familia de TNF (TNF, Fas ligando -Fas L-, TRAIL) a sus receptores (receptores de muerte: TNRF, Fas, Trail-R1, R2-Trail, DR3, DR6). Esta unión a receptores producirá finalmente la exposición de dominios efectores de muerte, resultando en la activación de la caspasa 8. Un vez activada, dicha caspasa induce la activación de caspasas efectoras (los tipos 3, 6 y 7). Por otro lado, la vía intrínseca de la apoptosis se basa en un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, seguida de la liberación del citocromo c y la activación del apoptosoma, que promueve la activación de la caspasa 9, la cual induce la actividad de las caspasas 3, 6 y 7 (Rodríguez y cols., 2013).

Los tumores hematológicos son los que se han estudiado mejor, y los que presentan los resultados más uniformes con relación al efecto proapoptótico de la melatonina. Por ejemplo, se ha descrito la activación de la caspasa-3 después del tratamiento con melatonina en las líneas celulares de linfoma de Burkitt (Trubiani y cols., 2005) y en células HL60 (Rubio y cols., 2007), así como la activación de caspasa 7, 8 y 9 en células de linfoma mieloide o linfoma de Burkitt (Rubio y cols., 2007; Sanchez-Hidalgo y cols., 2012). Adicionalmente se ha observado la disminución en los niveles de la proteína anti-apoptótica, Bcl-2, en células LNCaP (Kim y Yoo 2010) o células de leucemia mieloide como HL60 (Bejarano y cols., 2009) y K562 (Bejarano y cols., 2011). Pero también se han estudiado los efectos anticancerosos de la melatonina en muchos otros tejidos. En nuestro Departamento, además de los estudios en líneas celulares sanguíneas que hemos mencionado, se ha observado la activación de caspasa 3 en respuesta a melatonina en células AR42J, que son células derivadas del páncreas (Gonzalez y cols., 2011).

Un aspecto muy interesante de la melatonina y que se ha considerado la base de sus efectos antitumorales es que, a pesar de las propiedades antioxidantes, a las altas concentraciones descritas anteriormente se ha observado un aumento temprano del

estrés oxidativo en las células tumorales, donde la melatonina induce la apoptosis. Se ha observado un aumento de la producción de ERO en células HepG2 (Osseni y cols., 2000), en células Jurkat (Wolfler y cols., 2001) o en las líneas AML, HL60, células K562 y células CML (Bejarano y cols., 2011). Las ERO pueden inducir la apoptosis a través de la vía mitocondrial, mediante la interacción con proteínas del complejo de transición de permeabilidad mitocondrial (Tsujiimoto y Shimizu 2007). La modificación oxidativa de tal complejo puede colapsar el potencial de membrana mitocondrial y desencadenar la translocación de Bax y la activación de la proteína pro-apoptóticas Bad y la liberación de citocromo c al citosol (Cook y cols., 1999). Además, las ERO generadas pueden también activar vías de señalización involucrando a JNK (donde Trx1 actúa como sensor) y p38 (Saitoh y cols., 1998). La activación de estas cinasas también se acompaña de un aumento en los niveles y actividad de proteínas proapoptóticas como p53, p21 y de las caspasas 8, 9 y 3 (Martin-Renedo y cols., 2008), con lo que se consideran vías por las que la melatonina podría conducir a estos tipos celulares a la apoptosis.

3 Objetivos

Objetivos

Nuestro objetivo principal será el de tratar de esclarecer las acciones de diferentes antioxidantes sobre la viabilidad y la funcionalidad en varios modelos celulares: células acinares pancreáticas, astrocitos de hipocampo y células AR42J. Los antioxidantes elegidos han sido la melatonina y el ebselén. Para ello trataremos de contestar a los siguientes objetivos específicos:

1.- Determinar si la viabilidad y funcionalidad celular se ven moduladas en presencia de la melatonina y el ebselén.

2.- Determinar el efecto de la melatonina y el ebselén sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y su homeostasis.

3.- Estudiar el efecto de la melatonina y el ebselén sobre la actividad mitocondrial.

4.- Analizar si los antioxidantes seleccionados tienen algún efecto sobre la proliferación celular y el desarrollo de procesos apoptóticos y/o necróticos.

5.- Identificar los posibles mecanismos moleculares implicados en las acciones de la melatonina y el ebselén en nuestros modelos celulares.

Our main objective is to clarify the actions of different antioxidants on the viability and the function in various cell types: pancreatic acinar cells, hippocampal astrocytes and AR42J cells. Melatonin and ebselen are the antioxidants chosen for this purpose. We will try to accomplish the following specific objectives:

1. To determine whether cell viability and functionality are modulated in the presence of melatonin and ebselen.

2. To analyze the effect of melatonin and ebselen on $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis.

3. To study the effect of melatonin and ebselen on mitochondrial activity.

4. To analyze whether the antioxidants that we have chosen have any effect on cell proliferation and on apoptotic and / or necrotic processes.

5. To identify the molecular mechanisms involved in the actions of melatonin and ebselen on our cell models.

Objetivos

4 Material y métodos

4.1 Lista de reactivos

ACDEVD-AMC, sustrato de caspasa-3: SIGMA[®].

Albúmina: SIGMA[®].

Ácido acético glacial: SIGMA[®].

AlamarBlue[®]: Invitrogen[®]

BAPTA, 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester): SIGMA[®].

BSA: albúmina sérica bovina SIGMA[®].

CellLytic[™] MT Cell Lysis Reagent: SIGMA[®]

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropil)dimetilammonio]-1-propanosulfonato hidrato: SIGMA[®].

Cocktail inhibidor de proteasas: SIGMA[®]

Colagenasa: Worthington Biochemical Corp

Colágeno de cola de rata: BD Biosciences.

Dexametasona: SIGMA[®]

DMEM: GIBCO[®] (Invitrogen[®]).

DMSO: dimetilsulfóxido MERK-SCHUCHARDT[®].

DTT, dithiothreitol: SIGMA[®].

Ebselén: 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, SIGMA[®].

EGTA, Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid: SIGMA[®].

FBS: Fetal Bovine Serum, suero bovino fetal HyCLONE[®].

FCCP, carbonil cianida 4-(trifluorometoxy) fenilhidrazona: SIGMA[®].

Fragmento 26-33 de CCK: CCK-8 SIGMA[®].

Fura-2/AM: fura-2 acetoximetil éster (cell permeant) Invitrogen[®].

H₂O₂. Peróxido de hidrógeno: SIGMA[®].

HBSS: GIBCO[®] (Invitrogen[®]).

HEPES: (ácido N-[Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]) SIGMA[®].

Horse Serum: GIBCO[®].

Inhibidor de tripsina: SIGMA[®].

Ioduro de propidio: SIGMA[®].

L-cisteína: FLUKA[®].

L-Glutamato: FLUKA[®].

L-Glutamina: (BioWhittaker[®]; Lonza, Basilea, Suiza)

Medio 199: GIBCO[®].

MITO+: BD Biosciences.

MitoTracker Green^{FM}: Invitrogen[®]

Ortovanadato sódico: SIGMA[®]

Papaína: Worthington Biochemical Corporation.

Penicilina/estreptomicina: PAA Laboratories GMBH.

Phadebas reagent: Pharmacia Diagnostics (Uppsala, Sweden).

Poli D-lisina: SIGMA[®].

Reactivo de Bradford (Comercial): BIORAD[®].

Ribonucleasa A: SIGMA[®].

RPMI 1640: sin L-Glutamina (BioWhittaker[®]; Lonza).

SDS: Ilauril sulfato sódico, SIGMA[®].

TMRM, Tetramethylrhodamine methyl ester: Invitrogen[®].

TPS: tapsigargina, SIGMA[®].

Material y métodos

TRIS base: SIGMA[®].

Tripsina-EDTA: GIBCO[®] (Invitrogen[®]).

Tween[®]-20: SIGMA[®].

Los demás reactivos utilizados rutinariamente en el laboratorio para la preparación de soluciones fisiológicas, han sido de grado analítico. En todas las soluciones utilizadas el agua empleada es de calidad milli-Q.

4.2 Animales de estudio

Para la realización de los experimentos con los que se han obtenido los resultados que se exponen en esta Tesis Doctoral se han empleado ratas *Wistar* neonatas de ambos sexos. Se trataba de animales recién nacidos, que tenían unas 24 horas de vida, y se usaron para preparar los cultivos de astrocitos de hipocampo. Por otra parte, se han empleado ratones *Swiss* machos adultos (6 semanas de vida), de los que se aislaron las células acinares pancreáticas. Estos animales se obtuvieron del Servicio Animalario de la Universidad de Extremadura, fueron tratados de acuerdo a lo dispuesto en la normativa legal vigente relativa a la utilización de animales en la experimentación científica (RD 1201/2005 y RD 53/2013), y los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura.

4.3 Aislamiento de los hipocampos y preparación de los cultivos de astrocitos

4.3.1 Material y soluciones

Para la obtención de los astrocitos y la preparación de los cultivos se emplearon varias soluciones y un medio de cultivo suplementado con requerimientos nutricionales y antibióticos. Todas estas soluciones fueron preparadas y manipuladas en condiciones estériles, en una cabina de flujo laminar. El aislamiento de los astrocitos se realizó por digestión enzimática con papaína, mediante incubación de los hipocampos en una solución enzimática (4 mL de volumen final), cuya composición se detalla en la tabla 1.

Producto	Cantidad
L-cysteine	10 mg
DMEM	50 mL
CaCl ₂	0,5 mL (1 alícuota, de un stock 100 mM)
EDTA	0,5 mL (1 alícuota, de un stock 50 mM)
Papaína	20-25 unidades / mL de solución enzimática

Tabla 1. Composición de la solución enzimática (50 mL).

Rutinariamente se preparaba un volumen de 50 mL, que se esterilizaban por filtración (haciéndose pasar a través de un filtro de 0.20 µm de tamaño de poro); no se añadía la papaína y luego se dividía en alícuotas de 4 mL, que se congelaban para su posterior uso cuando se hiciera preparación de cultivos. El día en el que se utilizaba, se descongelaba el vial y se aireaba con gas carbógeno (durante unos 20 minutos), y en este momento se añadía la (hay que poner las unidades de actividad de papaína/mL) y se filtró para mantener la esterilidad.

Producto	Volumen
Dulbecco's MEM	180 mL
Fetal Bovine Serum (FBS)	20 mL
Penicilina/Estreptomicina	800 µL (20000 IU penicilina / 20 mg estreptomicina)
MITO +	200 µL

Tabla 2. Composición del medio de cultivo de astrocitos.

En el proceso de aislamiento de los astrocitos (para diferentes lavados intermedios), y para su posterior cultivo, se empleó un medio de cultivo cuya composición está detallada en la tabla 2.

Este medio de cultivo se preparaba en condiciones estériles en la campana de flujo laminar, y posteriormente se hacía pasar a través de un filtro de 0.20 µm de tamaño de poro.

También se preparó una solución que denominamos de inactivación, que se emplea en un paso intermedio del proceso de aislamiento de los astrocitos. La composición de esta solución se describe en la tabla 3.

Producto	Cantidad
Albúmina	125 mg
Inhibidor de tripsina	125 mg
Medio de cultivo de Astrocitos	50 mL

Tabla 3. Composición de la solución de inactivación.

Esta solución también se preparaba en condiciones estériles, y se repartió en alícuotas de 4 mL cada una, que luego se congelaban hasta su posterior uso.

En el proceso de aislamiento de los astrocitos también se empleó un medio HBSS (disponible comercialmente), utilizado para el lavado del cerebro tras su extracción. En este medio se aislaban, mediante microcirugía, los hipocampos.

Otra solución utilizada en el manejo de los cultivos de astrocitos, fue un tampón fosfato (PBS). El PBS es un reactivo común que se emplea en diversas aplicaciones. En nuestro caso se empleaba para el lavado de los cultivos de los astrocitos a las 24 horas de su preparación, y antes de despegarlos con solución de tripsina. La composición del PBS está descrita en la tabla 4.

Producto	Molaridad	PM	g / L
NaCl	137 mM	58,44	8,0063
KCl	2,7 mM	74,56	0,2013
Na ₂ HPO ₄	10 mM	177,99	1,7299
KH ₂ PO ₄	2 mM	136,09	0,2722

Tabla 4. Composición del PBS.

Se pesaron estas cantidades y se disolvieron en 800 mL de agua milli-Q. Posteriormente se ajustó el pH a 7´4 y se llevó hasta un volumen de 1 litro. La solución se repartió en alícuotas de 50 mL y se esterilizaron en autoclave o por filtración.

Los astrocitos se sembraron en frascos de cultivo (de 75 o 25 cm²), en placas multipocillo -de 6, 12 o 24 pocillos-, o sobre cubreobjetos de vidrio colocados dentro de una plaquita de cultivo (33 mm de diámetro). En este último caso, es necesario tapizar los cubres con una matriz de colágeno y poli-lisina, que denominamos “coating mixture”. Su composición está detallada en la tabla 5.

Producto	Volumen
Ácido acético glacial	300 μ L de 17 mM (preparado en H ₂ O milli-Q)
Poli D-lisina	100 μ L (stock de 5 mg en 10 mL H ₂ O milli-Q)
Colágeno de cola de rata	100 μ L (4.33 mg/mL en ácido acético 0.02 N)

Tabla 5. Composición del “coating mixture”.

Los cubreobjetos (circulares, de 24 mm de diámetro) se prepararon de la siguiente manera: en la campana de flujo laminar, en primer lugar se esterilizaron con etanol absoluto a la llama y posteriormente, utilizando bastoncillos autoclavados se recubrió cada cubre con la “coating mixture” y se dejaron secar (unos 30 minutos).

4.3.2 Preparación de los cultivos

Los astrocitos se aislaron del hipocampo, extraído de los animales tras su sacrificio. Previamente se tiene que preparar un espacio en las condiciones más asépticas posibles, rociando el material con etanol al 70 %. Los animales, ratas *Wistar* neonatas, se sacrificaron por decapitación. Se reducía al máximo la manipulación de los animales para minimizar cualquier tipo de estrés que se les pudiera causar. A continuación se puso la cabeza sobre una placa de Petri y con ayuda de unas pinzas se sujetaba la cabeza del animal y se realizaron dos incisiones con unas tijeras muy finas en la zona laterodorsal, primero en piel y posteriormente en el cráneo (que es fácil de cortar porque aun no está osificado) partiendo desde el agujero magno. No se introducía mucho la punta de las tijeras para no dañar la masa encefálica. Seguidamente, y con una espátula pequeña y ligeramente curva en el extremo, se extrajo el cerebro y se puso en una placa de Petri que contenía medio HBSS frío. Se separó el cerebelo cortándolo con un bisturí y luego se procedió a realizar un corte longitudinal con el bisturí para separar los dos hemisferios cerebrales. Ésta y las siguientes operaciones se realizaron bajo observación en un estereomicroscopio.

A continuación, se tomó uno de los hemisferios y por la parte medial se accedía al hipocampo para su disección mediante la utilización de dos pinzas de microcirugía. Extraído el hipocampo, se limpiaba de las meninges que lo rodean y se ponía en el tubo con la solución enzimática (en un baño termostatzado provisto de agitación, a 37 °C). Se repitió esta operación con el otro hemisferio cerebral y con los demás animales. En cada preparación se utilizaba un máximo de cuatro animales.

En esta solución enzimática se incubaron los hipocampos durante 60 minutos a 37°C y en agitación. Concluida esta incubación, se retiró la solución enzimática centrifugando la suspensión durante 5 minutos a 80 × *g*. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendía el pellet en la solución de inactivación, en la que se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente (22-25°C), para a continuación centrifugar nuevamente (80 × *g*). Todos los pasos de eliminación de sobrenadantes tras las centrifugaciones, de cambios de soluciones y los que se detallan a continuación, se realizaron en la cabina de flujo laminar, ya que el objetivo es evitar su contaminación. Tras esta última centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de medio de cultivo de astrocitos. Seguidamente se realizó una disgregación mecánica muy suave mediante pipeteo, hasta la completa disgregación del tejido.

A continuación, se repartió el contenido del tubo en frascos de cultivo de 75 cm² (provistos de tapón de venteo) y se añadió medio de cultivo de astrocitos hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. Seguidamente se alojaban los frascos en el incubador a 37 °C y bajo atmósfera con 5% CO₂.

Transcurridas las primeras 24 horas tras la preparación se realizaba un lavado de los astrocitos, cambiando el medio de cultivo por PBS. Simplemente se retiraba el medio de cultivo de astrocitos, se añadía PBS (8 mL a los frascos y 1 mL a las placas independientes), que a continuación se decantaba y se volvía a añadir medio de cultivo de astrocitos (16 mL en los frascos y 3 mL en el caso de las placas de cultivo). En el caso de que hubiera muchos restos celulares flotando, se repetía la operación de lavado con PBS. Es importante conseguir un cultivo limpio, ya que las células crecerán mejor. A continuación, las células incubaron durante 2 semanas hasta que los cultivos alcanzaban la confluencia.

Material y métodos

Pasado este tiempo, se podían hacer resiembras de los astrocitos. Para ello se retiraba el medio de cultivo, y se realizaba un lavado con PBS. A continuación, se añadían 6 mL de una solución de tripsina-EDTA, y se incubaban durante 5-10 minutos (en el incubador de CO₂). Cada poco tiempo (1 minuto aproximadamente) se observaba el frasco hasta ver que las células se desprendían del fondo del frasco. No era recomendable dejar las células en presencia de tripsina durante excesivo tiempo.

Por la acción de la tripsina, los astrocitos se despegan de la superficie del frasco en la que están adheridos. La tripsina es una enzima que actúa sobre la matriz extracelular (proteínas que mantienen las células en contacto unas con otras y con la superficie de cultivo) para separar a las células unas de otras y de la superficie donde se hallan fijadas; muchas de estas uniones proteína-proteína son dependientes de Ca²⁺ y otros cationes divalentes, de forma que el quelante de estos (EDTA), favorece la disgregación. Con el lavado previo de los astrocitos con PBS se pretende eliminar restos de FBS que contiene el medio de cultivo de astrocitos ya que éste, al ser rico en proteínas, puede hacer que la tripsina no actúe con la eficacia deseada sobre los astrocitos.

Finalizada la incubación con la solución de tripsina-EDTA, se depositaba el contenido del frasco en un tubo tipo falcon, se añadían 10 mL de medio de cultivo de astrocitos (para inactivar la tripsina), y se centrifugaba (5 minutos, 80 × g). Seguidamente se retiraba el sobrenadante, se resuspendía el pellet en 2 mL de medio de cultivo de astrocitos y se realizaba un recuento del número de células. En este momento las células estaban listas para su resiembra.

Se resembraban los astrocitos en frascos nuevos (aproximadamente 10⁴ células/cm²) o bien sobre los cubre-objetos. Se preparaban las plaquitas (33 mm de diámetro) con los cubre-objetos, ya tratados con la “coating mixture”, dentro (esta labor se realizó en la campana de flujo laminar). En cada plaquita se sembraban entre 250.000 y 750.000 células, y se añadía 3 mL de medio de cultivo de astrocitos. A continuación se incubaban a 37 °C en incubador (5% de CO₂) hasta que los cultivos alcanzaban confluencia (generalmente durante 7 a 10 días).

4.4 Aislamiento de las células acinares pancreáticas y preparación de los cultivos celulares

4.4.1 Aislamiento de las células acinares pancreáticas y preparación de cultivos

Como hemos mencionado anteriormente, las células acinares pancreáticas se obtuvieron de ratones *Swiss*. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical; seguidamente, se practicó una laparotomía lateral izquierda con ayuda de unas tijeras, se pinzó el peritoneo y se realizó una incisión por la que se accedía a la cavidad abdominal. El páncreas, se localiza entre la curvatura menor del bazo, al que está unido en su hilio por un repliegue peritoneal, y el duodeno, detrás del estómago. Se sostuvo el bazo con unas pizas y con la ayuda de unas tijeras finas, se seccionaban las uniones del páncreas con el duodeno y se extrajo el tejido unido al bazo. El páncreas se depositaba para su lavado en solución Na-HEPES de aislamiento, una solución salina fisiológica cuya composición se detalla en la tabla 7. A continuación, se retiró el bazo, los nódulos linfáticos y el tejido graso que habían sido extraídos junto con el páncreas.

Producto	Mw	[mM]	g/L
NaCl	58.44	130	7.5972
KCl	74.56	4.7	0.350432
CaCl ₂	147.02	1.3	0.191126
MgCl ₂ *6H ₂ O	203.3	1	0.2033
KH ₂ PO ₄	136.09	1.2	0.163308
HEPES	238.3	10	2.383
Glucosa	180.16	10	1.8016
Albúmina		0.2% (w/v)	2

Inhibidor de Tripsina	0.01% (w/v)	0.1
------------------------------	-------------	-----

Tabla 6. Composición del tampón Na-HEPES de aislamiento.

Seguidamente, se inyectó en el tejido un pequeño volumen de esta solución de aislamiento, suplementada con colagenasa, que llamamos solución enzimática. Esta solución contiene 100 Unidades de colagenasa en 0,5 mL de tampón Na-HEPES de aislamiento. Con la ayuda de una jeringa y una aguja muy fina se inyectó este volumen de solución enzimática en el parénquima del órgano, tratando de introducirla de manera homogénea; posteriormente se incubó el tejido durante 10 minutos, en un baño orbital a 37 °C en agitación. Previamente se aireaba la solución con O₂. Concluida esta incubación se disgregó mecánicamente el tejido con unas tijeras, y seguidamente se realizó un pipeteo de la suspensión (haciendo pasar el tejido pancreático a través de puntas de pipeta de diámetro decreciente). A continuación se retiró la solución de colagenasa, mediante centrifugación durante 5 minutos a 80 × *g* en centrífuga refrigerada (4°C). Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en Na-HEPES de aislamiento sin colagenasa, y se volvió a pipetear el tejido; a intervalos de tiempo se dejaba que se depositaran los trozos más grandes en el fondo del tubo y se retiraba el sobrenadante, donde se encuentran las células y acinos que se han ido desprendiendo. Se añadía Na-HEPES fresco y se repetía el proceso. Finalmente, se centrifugaba la suspensión obtenida (80 × *g*) y se resuspendía el precipitado en Na-HEPES fresco. El resultado es una suspensión de células acinares pancreáticas aisladas y de acinos de diferente tamaño, que ya se pueden usar para ensayos en células frescas, o para su siembra y preparación de cultivos.

Los cultivos se prepararon sembrando las células en placas multipocillo. El medio empleado en los cultivos de células acinares pancreáticas es un medio RPMI suplementado con FBS, glutamina y antibióticos. La composición del medio de cultivo está detallada en la tabla 7. Este stock se debe preparar en condiciones estériles en la campana de flujo laminar, y posteriormente debe esterilizarse (filtro de 0.20 µm). Para el cultivo de las células se centrifugaron tras su aislamiento, se retiró el Na-HEPES y se

sustituyó por medio de cultivo. A continuación, se repartió la suspensión de células en placas multipocillo y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂.

Producto	Volumen
RPMI 1640	500
FBS (10%)	55.56
L-Glutamina (200mM)	5.6
Penicilina-Estreptomicina	5.6

Tabla 7. Composición del medio de cultivo usado.

4.5 Cultivo celular de la línea celular tumoral pancreática AR42J.

4.5.1 Obtención de la línea celular.

La línea celular AR42J (ECACC nº 93100618) fue suministrada por la “European Collection of Cell Culture” (Dorset, UK).

4.5.2 Método de cultivo.

El cultivo de la línea celular AR42J se realizó en semisuspensión en un medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal, L-glutamina (2 mM) y un cóctel de antibióticos. La composición del medio de cultivo está descrita en la tabla 7. El cultivo se mantuvo en un incubador a 37°C, en atmósfera con 95% O₂ y 5% CO₂, siguiendo las instrucciones de la casa comercial suministradora. Cada 48 horas, se sustituía el medio de cultivo por medio fresco.

Material y métodos

Las células pancreáticas AR42J se sembraron y se cultivaron en frascos de cultivo de 75cm². Cuando estos cultivos fueron confluentes se realizaron resiembras en placas, cubreobjetos o placas multipocillos, según se requiriera para la realización de los experimentos. Para despegar las células de la superficie en la que se cultivaban, se incubaron con una solución de Tripsina/EDTA, siguiendo el mismo procedimiento descrito para los astrocitos.

Previamente a su uso, las células se incubaron en presencia de dexametasona, proceso con el que se consigue la diferenciación de las células AR42J hacia un fenotipo de células exocrinas pancreáticas. Así, 72 horas antes de los experimentos, se sustituyó el medio de cultivo por medio de diferenciación (medio de cultivo suplementado con 100 nM de dexametasona).

4.6 Determinación de la viabilidad y proliferación celular.

La determinación de la viabilidad y proliferación celular se realizó mediante la técnica del *AlamarBlue*[®]. Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar la actividad celular, y se basa en el poder reductor de las células vivas. El componente activo del *AlamarBlue*[®] es la resazurina. Se trata de un compuesto no tóxico, permeable a la membrana celular, que presenta un color azul y es virtualmente no fluorescente. Una vez que penetra en el interior de la célula, la resazurina es reducida por la actividad metabólica celular a resorufina, un compuesto que emite fluorescencia en el rango del color rojo. La fluorescencia se mide utilizando un espectrofluorímetro. Las células viables convierten continuamente la resazurina en resorufina, con lo que se puede utilizar esta reacción para la estimación de la viabilidad celular o por el contrario, de la toxicidad de una determinada droga.

La fluorescencia del compuesto resultante de la reacción es monitorizada a 590 nm de longitud de onda de emisión, y con una longitud de onda de excitación a 530-560 nm. El compuesto nos permite otra posibilidad, y es que también se puede monitorizar la absorbancia de las muestras, que se mide a 570-600 nm.

Por lo tanto, en aquellas células que no se vean afectadas por los tratamientos a los que están expuestas, las reductasas citoplasmáticas actuarán sobre la resazurina, convirtiéndola en resorufina y dando una coloración rosada en el medio de cultivo. Contrariamente, ante la no existencia de crecimiento aparecerá un color azul en el sobrenadante.

Las células se sembraron en placas multipocillo y se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 horas en presencia de los diferentes estímulos, determinándose la viabilidad a esos tiempos, y evaluando su posible toxicidad. En cada grupo experimental, hubo células que no fueron tratadas con ningún estímulo, sólo se incubaron con un volumen del medio en que se preparaba el estímulo, y se utilizaron como referencia (células no estimuladas).

Una vez concluida la incubación en presencia de los diferentes estímulos, se añadió a las células un 1% (concentración final) de la solución comercial de *Alamarblue*[®], y se realizó una incubación durante 1 hora dentro del incubador. Seguidamente, se tomaron 200 µl del sobrenadante de cada pocillo, y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. La lectura de viabilidad se realizó en un lector de placas (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria). Los resultados muestran la media de la reducción de *Alamarblue*[®] expresada en tanto por ciento con respecto a las células control (no estimuladas).

4.7 Determinación de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular

Los cambios inducidos por los diferentes estímulos sobre la [Ca²⁺]_i se estudiaron empleando dos procedimientos diferentes. Unos estudios se realizaron en suspensiones celulares (empleando un espectrofluorímetro) y otros ensayos se realizaron utilizando un sistema de análisis de imagen en células individuales (empleando un microscopio invertido de fluorescencia). Los dos procedimientos se basan en el mismo principio: la fluorescencia emitida por la sonda fluorescente fura-2.

Las células son incubadas en presencia de la forma acetoximetil éster de este fluoróforo (fura-2/AM). La molécula de este compuesto posee en su estructura un grupo

acetoximetilo, que le confiere un carácter apolar, de forma que el fura-2/AM puede difundir a través de las membranas celulares. Una vez en el citoplasma las esterasas citoplasmáticas hidrolizan el enlace que mantiene el fura-2 unido al grupo orgánico metilo, lo que provoca un cambio en la molécula, de un carácter apolar a un carácter polar. De esta forma la molécula de fura-2 permanece atrapada dentro de la célula.

La principal peculiaridad que posee este compuesto es que sus propiedades de fluorescencia cambian en función de la concentración de Ca^{2+} libre presente en el medio donde se halla la sonda. Esta sonda se excita con luz ultravioleta a dos longitudes de onda diferentes, 340 y 380 nm, y emite fluorescencia a 505 nm a las dos longitudes de onda de excitación. Cuando se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ la fluorescencia emitida tras su excitación a 340 nm aumenta, mientras que la emitida tras su excitación a 380 nm disminuye. Este mecanismo le permite ser un excelente sensor de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya que los cambios en su fluorescencia están directamente relacionados con los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Grynkiewicz y cols., 1985). Los resultados se expresan como el ratio (cociente) de fluorescencia emitida por el fura-2 (505 nm) a las dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm); dicho de otra forma, como el cociente de dividir los valores de la fluorescencia emitida a 505 nm cuando se excita a 340 nm entre los valores de la fluorescencia emitida a 505 nm cuando sonda es excitada a 380 nm.

4.7.1 Carga con el indicador

Los estudios en suspensiones celulares se realizaron utilizando células AR42J en cultivo. Las células AR42J eran previamente despegadas y resuspendidas en medio Na-HEPES de aislamiento (composición detallada en la tabla 7). A continuación, se incubaron las células a temperatura ambiente (20-25°C), en presencia de una concentración 4 μM de fura-2/AM, y durante 40 minutos en oscuridad. Seguidamente se procedía a centrifugar las células para eliminar los restos de la sonda del medio extracelular. Por último, las células se resuspendían en un volumen determinado del buffer Na-HEPES, y se utilizaban inmediatamente.

Los estudios de monitorización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células individuales se realizaron en astrocitos cultivo y en células acinares pancreáticas frescas. Para proceder a la carga de

las células en cultivo con el fura-2, sustituimos primero el medio de cultivo por medio Na-HEPES de aislamiento, al que se añadía fura-2/AM (concentración final de 4 μM). Posteriormente se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente (20-25°C) y durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo las células eran utilizadas inmediatamente. En el caso de las células acinares pancreáticas frescas, una vez obtenidas, se incubaron con Na-HEPES de aislamiento en presencia de fura-2/AM, en las mismas condiciones descritas. Concluida la incubación, se centrifugaron las células para eliminar los restos del indicador del medio, se resuspendieron en Na-HEPES de aislamiento, y se utilizaron. Estos procedimientos y técnicas se emplean rutinariamente en nuestro laboratorio (del Castillo-Vaquero y cols., 2010; Fernandez-Sanchez y cols., 2009; Gonzalez y cols., 2006a; Salazar y cols., 2008b).

4.7.2 Cuantificación de la fluorescencia del fura-2

Para el análisis de la fluorescencia en suspensiones celulares, se introducían alícuotas de 2 mL de la suspensión celular en una cubeta de cuarzo dentro de un espectrofluorímetro (modelo RF-5001PC de Shimadzu). La monitorización de los cambios producidos en la fluorescencia del fura-2, directamente relacionados con cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se realizó empleando un software específico. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas son las descritas en el apartado anterior.

La técnica de análisis de imagen (“imaging”) permite seguir cambios de fluorescencia en continuo en células individuales. Este procedimiento se utilizó para estudios con células en cultivo (astrocitos) y células acinares frescas. Para la monitorización de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por este procedimiento en células en cultivo, se colocaban los cubre-objetos con las células ya cargadas con fura-2 dentro de una cámara de perfusión fabricada para este propósito; el volumen total interno de la misma no supera los 400 μL . Esta cámara de perfusión estaba colocada sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia (modelo Diaphot 200 de NIKON®) equipado con un objetivo NIKON® Fluor $\times 40$ para fluorescencia.

En el caso de las células acinares pancreáticas frescas, una vez cargadas con la sonda fluorescente, se depositaban alícuotas (50 μL) de la suspensión de células sobre

Material y métodos

un cubreobjetos introducido en la cámara de perfusión. En este caso debemos esperar un breve periodo de tiempo para que las células se depositen en el fondo y adhieran al cristal con el fin de que el flujo de la perfusión (más lento en este caso) no las arrastre.

Producto	Mw	[mM]	g/l
NaCl	58,44	140	8,1816
KCl	74,56	4,7	0,350432
CaCl ₂	147,02	1,3	0,191126
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,3	1	0,2033
HEPES	238,3	10	2,383
Glucosa	180,16	10	1,8016

Tabla 8. Composición del tampón Na-HEPES

Las células se perfundían con un tampón Na-HEPES, de la composición descrita en la tabla 8, a una velocidad de flujo de 3 mL/min, lo que permitía renovar completamente el contenido de la cámara en un corto período de tiempo (10 segundos aproximadamente). Los agentes que se querían ensayar se preparaban en este tampón Na-HEPES, y los experimentos se realizaban a temperatura ambiente (22-25°C).

Para el análisis de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se utilizó un sistema de adquisición y análisis de imágenes para microscopía (Hamamatsu Photonics). La luz de excitación era proporcionada por una lámpara de xenón, y mediante un monocromador de alta velocidad (Polychrome IV, Photonics), se seleccionaban las longitudes de onda de 340 y 380 nm, con las que se excitaban las células cargadas con Fura-2. La fluorescencia emitida a 505 nm se detectó mediante una cámara digital CCD refrigerada (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu), y se monitorizó empleando un programa específico (Aquacosmos

2.5, Hamamatsu Photonics). La autofluorescencia de las células representaba menos del 3% de la señal emitida y, por tanto, no era sustraída en los cálculos.

4.8 Determinación de la secreción de amilasa

La determinación de la cantidad de amilasas secretada por las células acinares pancreáticas se llevó a cabo por el Phadebas[®] Amylase Test (Gardner y Jackson 1977). Se trata de un método colorimétrico muy útil para el análisis cuantitativo del contenido de α -amilasa en una solución o líquido biológico. El reactivo es un sustrato polímero de almidón insoluble, portador de un colorante azul. Este sustrato se hidroliza por acción de la α -amilasa dando lugar a fragmentos azules solubles en agua. La absorbancia de la solución azul es proporcional a la actividad de la α -amilasa en la muestra.

En cada experimento, las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado. Una vez aisladas las células acinares pancreáticas, se preparó una suspensión stock, que se repartiría en diferentes grupos para ser incubadas con los estímulos. Al comienzo de los experimentos se tomó una muestra de la suspensión, 300 μ L, que se centrifugó a 1500 \times g durante dos minutos, y se almacenó en frío; el objetivo era detener la secreción de amilasas de los acinos que se encontraban en dicha muestra de la suspensión. Estas muestras, denominadas “muestras cero”, sirven para conocer la cantidad de amilasas que había en el sobrenadante de la solución acinar previo al inicio de la incubación con los distintos estímulos; este valor se introduce en una fórmula matemática utilizada para realizar los cálculos de secreción de amilasa.

También, se tomaron otras 2 muestras de la suspensión acinar (500 μ L), a las que se les añadieron 5 ml de una solución de lisis (ver composición en la tabla 9). Esta solución es capaz de romper las membranas celulares, permitiendo que el contenido total de amilasas que hay en cada célula sea liberado. Estas muestras se denominaron “muestras totales” y nos permitieron conocer la cantidad total de amilasas presente en las células. Este valor también es utilizado para realizar los cálculos de secreción de amilasa.

Reactivos	Concentración final
NaH₂PO₄	10mM
SDS (lauril sulfato sódico)	0,1%
CaCl₂	4mM
Albúmina sérica bovina	0,1%

Tabla 9. Composición de la solución de lisis

La suspensión restante de células acinares se repartió entre los distintos pocillos de una placa de cultivo (500 μ L). Las células se oxigenaron y se incubaron en presencia de los diferentes estímulos durante 30 min a temperatura de 37°C. Un grupo de células se incubó en ausencia de estímulo, con el fin de conocer la secreción de amilasas en ausencia de estímulo o secreción basal. Una vez pasados los 30 min de incubación, se tomaron 300 μ l de cada muestra y se centrifugaron (1500 \times g durante dos minutos,).

Durante el tiempo de incubación de las células con los diferentes estímulos, se preparaba la solución de reactivo de Phadebas® Amylase Test (ver composición en la tabla 10). Por cada 20 ml de reactivo de amilasas se añadía una pastilla de Phadebas® Amylase Test. La mezcla se mantuvo en agitación para que la suspensión del reactivo fuera uniforme, ya que el sustrato es insoluble en agua.

A continuación, se tomaron 50 μ l de las “muestras cero” y de las muestras correspondientes a las células incubadas con los estímulos, y se pusieron en un tubo de ensayo. Sobre estas muestras se añadieron 100 μ L de solución de lisis. También se tomaron 150 μ L de las “muestras totales”, que se pusieron en un tubo de ensayo. Sobre cada muestra se añadió con 1 mL de la mezcla del reactivo de Phadebas, y se incubaron a 37°C y sin agitación, durante un periodo de 10-15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con NaOH, (para ello se añaden 250 μ l de NaOH 0,5 N a cada tubo). A continuación se añadió a cada tubo 4 mL de agua destilada, tras lo cual se centrifugaron a 80 \times g durante 4 minutos, para separar el sustrato del sobrenadante y poder determinar colorimétricamente la cantidad de colorante liberado en cada tubo.

Reactivos	Concentración final
NaCl	50mM
NaH ₂ PO ₄	20mM
Azida sódica	0,02%

Tabla 10 .Composición del reactivo de amilasas

Finalizado todo el proceso se determinó la absorbancia de las muestras a 620 nm de longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro, y se calculó la liberación de amilasa. Los resultados se expresaron como el porcentaje de amilasa liberada al medio extracelular, con respecto al total presente en los acinos al inicio de la incubación.

La secreción de amilasas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Secreción} = \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia muestra cero}}{(3,67 \times \text{Absorbancia muestra total}) - \text{Absorbancia muestra cero}} \times 100$$

El factor de corrección 3,67 se incluye en la fórmula debido a que la dilución final de los tubos totales al añadir 500 µL de suspensión acinar a 5 mL de solución de lisis fue 1/11, pero se añadió 3 veces más cantidad (150 µL) que de los tubos de las células estimuladas (50 µL) para la incubación con el reactivo de Phadebas, por lo tanto el factor de corrección es 11/3 (o 3,67). Los datos se representan además como valores sobre la secreción basal, para lo cual a todos los valores obtenidos se les resta el valor del basal, con objeto de poder comparar los distintos tratamientos.

4.9 Concentración de calcio mitocondrial

Estas determinaciones se realizaron en células AR42J y en astrocitos. Las células se sembraron en cubreobjetos, y se dejaron crecer hasta alcanzar confluencia. La sonda empleada fue rhod-2. Este fluoróforo se acumula en la matriz mitocondrial, y los cambios en su fluorescencia reflejan cambios en la $[Ca^{2+}]_m$. Para la carga con el indicador, se eliminó el medio de cultivo de la placa, se sustituyó por Na-HEPES de aislamiento, y se añadió rhod-2/AM (8 μ M). Las células se incubaron a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se retiró el medio de incubación y se reemplazó por Na-HEPES sin la sonda, y se realizó una incubación adicional durante 30 minutos a temperatura ambiente (Gonzalez y cols., 2003).

Para monitorizar los cambios en la fluorescencia de la sonda, se utilizó un sistema de microscopía láser confocal (Bio-Rad MRC 1024; American Laser Corp., Salt Lake City, UT). Los cubreobjetos con las células en cultivo, una vez cargadas con la sonda, se introdujeron en una cámara de perfusión, que se colocó sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon eclipse TE300; Nikon Instruments, Inc.) y se perfundieron continuamente con solución Na-HEPES.

Empleando un objetivo de inmersión en aceite de ($\times 60$) se tomaron imágenes de 256×256 pixels, con una resolución de 0.287 μ m/pixel, cada 4 segundos. Las células se excitaron con luz de 543 nm procedente de un laser de 25 mW de helio-neón. La fluorescencia emitida se registró a 605/32 nm mediante un filtro de ancho de banda (Gonzalez y cols., 2003). Con el fin de reducir el blanqueamiento de la sonda se utilizaron filtros de interferencia de densidad neutra, reduciendo la intensidad de la luz del láser a 1%-3%. El software empleado para la toma y el análisis de las imágenes fue la versión 3.2 del Laser Sharp MRC-1024 (Bio-Rad, Deisenhofen, Germany). Los resultados se expresan en valores absolutos de la fluorescencia emitida a la longitud de onda de excitación empleada, y normalizados respecto al valor basal de fluorescencia.

4.10 Potencial de membrana mitocondrial

Para la monitorización de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial empleamos la sonda TMRM. Para la carga con el indicador, se eliminó el medio de cultivo de la placa, se sustituyó por Na-HEPES de aislamiento. Las células en cultivo se incubaron en presencia 50 nM de TMRM, durante 30 minutos a 37°C. Finalizada la incubación se utilizaban inmediatamente las células. Posteriormente al periodo de carga, no se añadió TMRM al medio extracelular. A la concentración utilizada, esta sonda se acumula en el interior mitocondrial. Una reducción en la fluorescencia de la sonda, indica una despolarización de la mitocondria, ya que el fluoróforo sale de la mitocondria y difunde hacia el citosol. Las imágenes de fluorescencia de las células cargadas con TMRM se obtuvieron utilizando el sistema de microscopía confocal descrito anteriormente, y las mismas condiciones de excitación y de captura de imágenes que se utilizaron para la monitorización de la $[Ca^{2+}]_m$. Los resultados se expresan en valores absolutos de la fluorescencia emitida a la longitud de onda de excitación empleada, y normalizados respecto al valor basal de fluorescencia.

4.11 Localización de la mitocondria

Para poder estudiar la distribución de las mitocondrias en las células se utilizó la sonda Mitotracker™ Green FM, siguiendo procedimientos descrito anteriormente (Gonzalez y cols., 2003). Para la carga con el indicador, se eliminó el medio de cultivo de la placa y se sustituyó por Na-HEPES de aislamiento. A continuación se añadió el fluoróforo (concentración final de 100 nM) y se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se utilizaban inmediatamente las células. Una vez terminada la incubación, el cubreobjetos se introdujo en una cámara de perfusión que se colocó en la pletina del microscopio que hemos descrito antes.

Empleando un objetivo de inmersión en aceite de ($\times 60$) se tomaron imágenes de 256×256 pixels, con una resolución de $0.287 \mu\text{m}/\text{pixel}$. Las células se excitaron con luz de 488 nm procedente de un laser de 100 mW de argón. La fluorescencia emitida se registró a 522/33 nm mediante un filtro de ancho de banda (Gonzalez y cols., 2003). Con

el fin de reducir el blanqueamiento de la sonda se utilizaron filtros de interferencia de densidad neutra, reduciendo la intensidad de la luz del láser a 1%-3%.

4.12 Determinación de actividad caspasa-3

Las células se incubaron en presencia de los diferentes estímulos durante 1 hora. Una vez finalizada, se añadió a cada placa un volumen de 500 μ L de tampón de lisis, cuya composición está descrita en la tabla 11, y ajustado a un pH de 7.4.

Reactivo	Cantidad
HEPES	50mM
CHAPS	5mM
DTT (añadir en fresco)	5mM

Tabla 11. Composición del tampón de lisis.

Se procedió a raspar la superficie de cada placa con un raspador de células y este sobrenadante se trasladó a un tubo eppendorf, donde se sonicaron las muestras a 4°C durante 5 segundos. Por último, se realizó una centrifugación de las muestras a 15.000 \times g durante 15 minutos en centrífuga refrigerada (4 °C) y se recogió el sobrenadante en un nuevo vial.

Para la determinación de la actividad caspasa-3 de cada muestra (realizada por triplicado), se tomaron 50 μ l de cada sobrenadante y se añadieron a un tubo con 2 mL de buffer de reacción, cuya composición se describe en la tabla 12. A esta solución se añadió sustrato de caspasa-3 (concentración final de 8.25 μ M). Durante la metabolización del sustrato de caspasa-3 (AC- DEVDAMC), se escinde un metabolito fluorogénico de forma proporcional a la activación de la caspasa; de esta forma se puede calcular la actividad de dicha enzima. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 1 hora, y posteriormente se tomaron 200 μ l de cada tubo y se pasaron a una placa

multipocillo para poder medir la actividad en el lector de placas (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria). La lectura se realizó excitando las muestras con luz de 360 nm y midiendo la emisión a 460 nm. Los valores se calcularon como unidades de fluorescencia total por mg de proteína, y se expresan como la media en porcentaje con respecto a los valores observados en las células no estimuladas.

Reactivo	Cantidad
HEPES	20mM
CHAPS	0.1%
EDTA	2mM
DTT (añadir en fresco)	5mM

Tabla 12. Composición del buffer de reacción.

4.13 Análisis de la fase de ciclo celular

La determinación de la fase de ciclo celular fue llevada a cabo mediante citometría de flujo y empleando el método de Vindelov (Clemens y cols., 2003; Seamer 1993).

Las células se sembraron en placas multipocillo (12 pocillos; 10^5 células/pocillo) y se dejaron crecer. A continuación se sometieron a los diferentes tratamientos (las células se incubaban en presencia de estímulo durante 5 días).

En primer lugar, se trasladó el sobrenadante de las placas a tubos de centrifuga, los cuales se centrifugaron a $1050 \times g$ durante 5 minutos. Y en las placas se realizó un lavado con PBS y se añadió el reactivo de Vindelov (pH ajustado a 8), cuya composición aparece en la tabla 13. En cada pocillo se realiza un pipeteo suave y constante para romper las membranas celulares, y de esta forma, poder liberar los núcleos (Clemens y cols., 2003). Seguidamente se recogía el sobrenadante de cada pocillo y se depositaba en su correspondiente tubo, centrifugándose durante 8 minutos a $1500 \times g$. A

Material y métodos

continuación, una vez eliminado el sobrenadante de cada tubo, se añadió al precipitado de núcleos 400 μ L de PBS suplementado con 20 μ L de yoduro de propidio (concentración 1 mg/mL). Las muestras se incubaron a 4°C hasta su lectura en el citómetro. Las muestras se analizaron por en citometría de flujo, preparando por triplicado cada muestra, se evaluaron 10^4 eventos en cada una. El equipo usado para esta determinación fue un citómetro de flujo FACscan (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU). El programa informático que se utilizó para evaluar de los datos obtenidos y determinar las secciones de cada fase de ciclo celular (G0/G1, S, and G2/M) fue Cell Quest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU). Los datos muestran el número de células en cada fase del ciclo celular, expresado en porcentaje.

Reactivo	Cantidad
TRIS 0.01M	100 μ L
ClNa 10mM	200 μ L
RNAasa 0.1mg/ml	100 μ L
Tween 0.1%	100 μ L
H ₂ Omq	9.5 mL

Tabla 13. Composición de la solución de Vindelov.

4.14 Tratamiento estadístico de los resultados.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de una vía de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba *post hoc* de Tukey, y sólo los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos en los experimentos se han expresado en las unidades descritas en cada apartado, mostrándose en las gráficas registros representativos de los diferentes tratamientos. Para comparaciones individuales y el análisis de las diferencias estadísticas entre

tratamientos individuales utilizamos el test de la t de Student, y solo valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5 *Resultados*

Melatonin modulates Ca^{2+} mobilization and amylase release in response to cholecystokinin octapeptide in mouse pancreatic acinar cells

Patricia Santofimia-Castaño · Deborah Clea Ruy ·
Ginés M. Salido · Antonio González

Received: 18 March 2013 / Accepted: 12 June 2013 / Published online: 2 August 2013
© University of Navarra 2013

Abstract In the present work, we have evaluated the effect of an acute addition of melatonin on cholecystokinin octapeptide (CCK-8)-evoked Ca^{2+} signals and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. For this purpose, freshly isolated mouse pancreatic acinar cells were loaded with fura-2 to study intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Amylase release and cell viability were studied employing colorimetric methods. Our results show that CCK-8 evoked a biphasic effect on amylase secretion, finding a maximum at a concentration of 0.1 nM and a reduction of secretion at higher concentrations. Pre-incubation of cells with melatonin (1 μM –1 mM) significantly attenuated enzyme secretion in response to high concentrations of CCK-8. Stimulation of cells with 1 nM CCK-8 led to a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$, followed by a decrease towards a constant level. In the presence of 1 mM melatonin, stimulation of cells with CCK-8 resulted in a smaller $[\text{Ca}^{2+}]_c$ peak response, a faster rate of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and lower values for the steady state of $[\text{Ca}^{2+}]_c$, compared with the effect of CCK-8 alone. Melatonin also reduced the oscillatory pattern of Ca^{2+} mobilization

evoked by a physiological concentration of CCK-8 (20 pM), and completely inhibited Ca^{2+} mobilization induced by 10 pM CCK-8. On the other hand, Ca^{2+} entry from the extracellular space was not affected in the presence of melatonin. Finally, melatonin alone did not change cell viability. We conclude that melatonin, at concentrations higher than those found in blood, might regulate exocrine pancreatic function via modulation of Ca^{2+} signals.

Keywords Pancreas · Calcium · Amylase secretion · Cholecystokinin · Melatonin · Cell viability

Abbreviations

$[\text{Ca}^{2+}]_c$	Cytosolic free Ca^{2+} concentration
CCK-8	Cholecystokinin octapeptide
EGTA	Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
Fura-2/AM	Fura-2 acetoxymethyl ester

P. Santofimia-Castaño · G. M. Salido · A. González (✉)
Department of Physiology (Cell Physiology Research
Group), University of Extremadura,
Avenida Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain
e-mail: agmateos@unex.es

D. C. Ruy
Faculdade de Agronomia & Medicina Veterinária,
Universidade de Brasília,
70900-100 Brasília, Federal District, Brazil

Introduction

The exocrine pancreas is highly specialized for the synthesis, storage and exocrine secretion of digestive enzymes. Exocrine pancreatic secretion is activated by nutrients, and is subject to neurohormonal regulation and to interdigestive (resting) periods [19, 32, 33, 35]. A rise in

cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) is an important early signal by which physiological secretagogues like cholecystokinin, acting in a concentration-dependent fashion, elicit the release of digestive enzymes from pancreatic acinar cells. Ca^{2+} signals are not only a result of Ca^{2+} release from intracellular stores [30] but also involve a coordinate influx from the extracellular space [25], Ca^{2+} extrusion across the plasma membrane [3] and Ca^{2+} uptake into intracellular organelles [8, 10].

Enzyme secretion is regulated via generation of repetitive local Ca^{2+} signals in the apical pole of pancreatic acinar cells, and the spatiotemporal pattern of agonist-induced Ca^{2+} signals is of critical importance for the exocytosis of enzymes [14]. Therefore, it is important to know how intracellular Ca^{2+} homeostasis and enzyme secretion are regulated.

Melatonin is produced in the mammalian pineal gland and retina following a circadian rhythm. High levels of melatonin are reached in the blood at night [29]. Melatonin membrane receptors have been identified in pancreatic stellate/myofibroblast cells, where the hormone regulates cell proliferation and differentiation. Other portions of the cell contain melatonin receptors/binding sites too [1]. Melatonin influences insulin release in pancreatic β -cells [31] and glucagon secretion in pancreatic α -cells [2]. It has also been shown that exogenous melatonin, as well as that produced endogenously from its precursor, L-tryptophan, stimulates pancreatic amylase secretion when given intraperitoneally or into the gut lumen [18].

Additionally, melatonin exerts a protective role against pancreatitis induced by caerulein [21, 26], by taurocholate [13] or by ischemia/reperfusion [20]. Melatonin also prevents acinar cell degeneration, apoptosis and polymorphonuclear leukocyte infiltration [4], and also shows favourable effects on the outcome of pancreatic fibrosis [1]. Moreover, melatonin administration reduces age-related alterations on pancreas in a senescence accelerated mice model [5]. The indoleamine also reduces cell death induced by oxidative stress in ischemia/reperfusion injury of the pancreas [24].

On the other hand, melatonin induces apoptosis in human pancreatic carcinoma cells [23] and reduces viability of AR42J cells by altering mitochondrial physiology [9]. Additionally, combined administration of capecitabine and melatonin provided an improvement in the antioxidant status and a synergistic anti-tumoural effect in experimental pancreatic cancer [28].

Despite the numerous studies carried out to understand the action of melatonin on cell physiology, the involvement of intracellular Ca^{2+} metabolism in melatonin-evoked effects needs to be further studied because most cellular activity is initiated by changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Moreover, interaction of melatonin with pancreatic secretagogues, and its consequences on enzyme secretion, deserves further research.

In this study, we have investigated the early effects of melatonin exposure on CCK-8-evoked Ca^{2+} signals, and its impact on amylase secretion, in mouse pancreatic acinar cells. Our objective is to shed more light on the mechanisms involved in the regulatory action of melatonin on the exocrine pancreas.

Materials and methods

Animals and chemicals

Adult male Swiss mice, weighing between 25 and 30 g, were used in the present study. Mice were obtained from the animal house of the University of Extremadura (Caceres, Spain). They were handled humanely and killed in accordance with the institutional Bioethical Committee. AlamarBlue® was purchased from AbD serotec (bioNova Científica, Madrid, Spain). Collagenase was obtained from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA). (Tyr[SO₃H]²⁷) Cholecystokinin fragment 26–33 amide (CCK-8), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) and melatonin were obtained from Sigma Chemicals Co. (Madrid, Spain). Foetal bovine serum (FBS) was purchased from HyClone (Thermo Scientific, Erembodegen, Belgium). Fura-2-acetoxymethyl ester (fura-2-AM) was obtained from Molecular Probes Inc. (Invitrogen, Barcelona, Spain). Glutamine, RPMI 1640 medium and penicillin/streptomycin were obtained from BioWhittaker (Lonza, Basel, Switzerland). Phadebas reagent for amylase determination was obtained from Pharmacia Diagnostics (Uppsala, Sweden). All other chemicals used were of analytical grade and were obtained from Sigma Chemicals (Madrid, Spain).

Preparation of isolated pancreatic acinar cells

A suspension of mouse pancreatic single cells and small acini was prepared as described previously [8]. Briefly, after mice had been killed by severing of the vertebral

column, the pancreas was removed rapidly and placed in a physiological Na-HEPES solution (composition, in millimolar: NaCl 130, KCl 4.7, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 1, KH₂PO₄ 1.2, glucose 10, HEPES 10) containing 0.01 % trypsin inhibitor (soybean) and 0.2 % bovine serum albumin (BSA) and pH adjusted to 7.4 with NaOH. This buffer was supplemented with 30 units/mL collagenase CLSPA from Worthington. Tissues were incubated for 10 min at 37 °C, after which the cell suspension was gently pipetted through tips of decreasing diameter for mechanical dissociation of the cells. After centrifugation at 30×g for 5 min at 4 °C, cells were resuspended in Na-HEPES buffer without collagenase. Cell viability was not significantly changed by the isolation procedure, as assayed by Trypan blue exclusion test, and was greater than 95 %.

Measurement of amylase release

Amylase release was measured as described previously [22]. Briefly, 1 mL aliquots of fresh acinar cells were incubated with the appropriate secretagogue at 37 °C for 30 min, followed by centrifugation at 500×g for 2 min. Amylase activity in the supernatant was determined using the Phadebas blue starch method, and data show the mean (±SEM) total amylase content expressed as percentage of the total content of amylase at the beginning of the incubation (*n*), where *n* is the number of independent experiments.

Fura-2 loading and determination of dye-derived fluorescence

Freshly isolated mouse pancreatic acinar cells, resuspended in Na-HEPES buffer, were loaded with fura-2-AM (4 μM) at room temperature (23–25 °C) for 40 min, as described previously [11]. Then, cells were centrifuged at 30×g for 5 min at 4 °C and resuspended in Na-HEPES buffer without trypsin inhibitor and BSA.

For monitorization of changes of fura-2-dependent fluorescence, related to changes in [Ca²⁺]_c, small aliquots of dye-loaded cells were transferred to a coverslip mounted on an experimental perfusion chamber, and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Diaphot T200, Melville, NY, USA).

The cells were continuously superfused with a control Na-HEPES buffer containing (in millimolar) 140 NaCl, 4.7 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES and 10 glucose (pH adjusted to 7.4). When Ca²⁺-free conditions were

applied, the Na-HEPES buffer contained no added Ca²⁺ and was supplemented with 0.5 mM EGTA. In order to determine fura-2-derived fluorescence, an image acquisition system was employed (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Cells were excited alternatively at 340/380 nm, with light from a xenon arc lamp passed through a high-speed monochromator (Polychrome IV, Photonics, Hamamatsu, Japan). Fluorescence emission at 505 nm was detected using a cooled digital CCD camera (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu, Japan) and recorded using dedicated software (Aquacosmos 2.5, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

The ratio of fura-2-emitted fluorescence closely reflects changes in [Ca²⁺]_c [12]. In this series of experiments, results are expressed in units of fluorescence (u. f.) as the ratio of fluorescence emitted at 340 and 380 nm excitation wavelengths, normalized to the basal fluorescence. All fluorescence measurements were made from areas considered individual cells.

For comparisons of the effects of CCK-8 on [Ca²⁺]_c, we calculated several values of the Ca²⁺ response: (1) the peak [Ca²⁺]_c response, which was the maximal value achieved after agonist stimulation of cells; (2) a 'steady-state level', calculated 5 min after application of the stimulus; (3) total Ca²⁺ mobilization after the stimulus, estimated as the integral of the rise in [Ca²⁺]_c over basal values for 5 min after the addition of CCK-8 and (4) the rate of decay of [Ca²⁺]_c to basal values after application of the stimulus, which was calculated using the constant of the exponential decay. Traces were fitted to the equation $y = A \times e^{-kx} + \text{plateau}$, where *k* is the exponential decay constant, *x* is time and *A* is the difference between the maximal and plateau values of [Ca²⁺]_c.

For comparisons of the effects of melatonin on Ca²⁺ influx, we analysed the following: (1) the [Ca²⁺]_c plateau, determined once [Ca²⁺]_c had reached a stable level after Ca²⁺ influx; (2) the amount of initial Ca²⁺ influx, estimated using the integral of the rise in [Ca²⁺]_c for 1.5 min after the addition of CaCl₂ and (3) the initial rate of increase in Ca²⁺ after the addition of Ca²⁺ to the medium. In this case, traces were fitted to the equation $y = A + kx$, where *k* is the slope.

Cell viability was not changed by the isolation procedure, as determined using the Trypan blue exclusion test, and was >95 %. After loading with the fluorescent dye, cells were kept at 4 °C until use, and experiments were performed within 4 h.

In experiments in which Ca²⁺-free medium was used, Ca²⁺ was omitted and 0.5 mM EGTA was added to the

extracellular solution. No apparent morphological changes of cells were observed that could yield errors in Ca^{2+} measurements.

All stimuli were dissolved in the extracellular Na-HEPES buffer, with or without Ca^{2+} , and applied directly to the cells in the perfusion chamber. Experiments were performed at room temperature (23–25 °C), and different batches of cells were used for the studies.

Cell culture

In brief, freshly isolated pancreatic acinar cells were seeded ($\approx 10^5$ cells) in multi-wheel plates (35-mm diameter per wheel) and incubated in culture medium at 37 °C under a humidified condition of 95 % air and 5 % CO_2 .

Culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine, 10 % FBS and antibiotics (0.1 mg/ml streptomycin, 100 IU penicillin). This medium was prepared under sterile conditions.

The experiments were done employing different batches of cells, obtained from different preparations (pancreas). All stimuli were dissolved in the culture medium and were added directly to the cells to reach the final concentration required.

Cell viability assay

Analysis of cell proliferation and cytotoxicity under the different treatments applied was carried out using alamarBlue® reduction test. This is a proven indicator of cell viability that uses the natural reducing power of living cells. The active ingredient of alamarBlue® (resazurin) is a non-toxic, cell-permeable compound that is virtually non-fluorescent. Upon entering cells, resazurin is reduced to resorufin, which produces bright red fluorescence. Viable cells continuously convert resazurin to resorufin, thereby generating a quantitative measure of viability and cytotoxicity.

To evaluate cell survival, isolated pancreatic acinar cells were seeded in 12 multi-well cell culture plates (22-mm diameter/well; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) at a cell density of 30,000/well. At this point, stimuli were added, and the cells were then allowed to grow in a humidified incubator at 37 °C and 5 % CO_2 . Cell viability was analysed at 24, 48 and 72 h of incubation.

At the required time point, alamarBlue® was added to the dishes at a final concentration of 10 %. Cell viability was estimated by measuring cellular fluorescence at

530/590 nm (excitation/emission), according to the manufacturer's instructions. An ELISA spectrofluorimeter (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria) was employed for the determinations. Data of cell viability show the mean reduction of alamarBlue® expressed in percentage \pm SEM (n) with respect to control (non-stimulated) cells, where n is the number of independent experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test, and only P values <0.05 were considered statistically significant. For individual comparisons and statistics between individual treatments, Student's t test was employed, and only P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of melatonin on CCK-8-evoked amylase secretion

Stimulation of pancreatic acinar cells with the secretagogue induced a dose-dependent release of amylase, resulting in a maximum at 10^{-10} M CCK-8 (Fig. 1). Pre-incubation of pancreatic acinar cells for 5 min with increasing concentrations of melatonin (1 μM –1 mM) reduced enzyme secretion in response to CCK-8 (Fig. 1). Even though the action of melatonin on CCK-8-stimulated amylase release was not dose-dependent, a slightly higher reduction of CCK-8-induced enzyme secretion was seen when cells were pre-incubated with 1 mM melatonin (Fig. 1, crossed bar), in comparison to the effect of pre-incubation with 1 μM melatonin (Fig. 1, open bar); this effect was specially observed when cells were stimulated with CCK-8 10^{-10} M, CCK-8 10^{-9} M and CCK-8 10^{-8} M. However, the differences in amylase release between melatonin treatments were not statistically significant.

Treatment of pancreatic acini with melatonin (1 μM –1 mM) alone did not induce any significant changes in amylase release, compared to non-stimulated (ne) cells (Fig. 1, inset).

Moreover, the biphasic effect of CCK-8 on amylase secretion was not changed by melatonin, compared to the effect of CCK-8 alone; this indicates that the sensitivity of acini to CCK-8 was not changed by melatonin

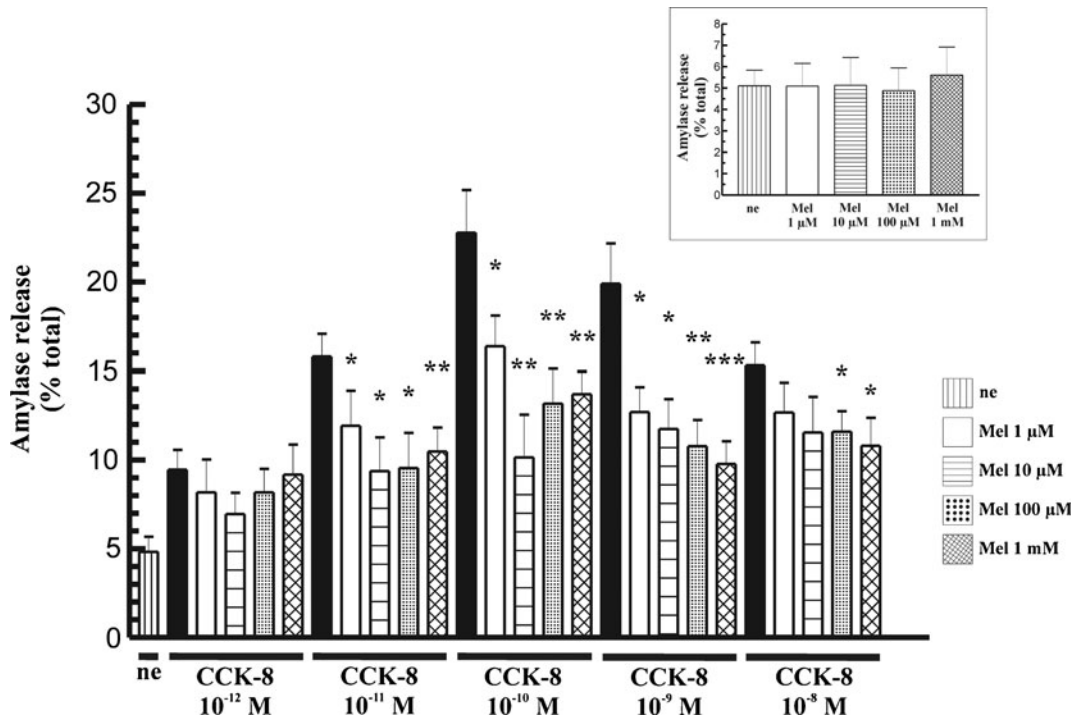


Fig. 1 Effects of melatonin (1 μM–1 mM) on cholecystikinin (CCK)-8-evoked amylase secretion. Pancreatic acinar cells were incubated with increasing concentrations of CCK-8 alone (vertical bar) or in the presence of increasing concentrations of melatonin (1 μM, open bars; 10 μM, horizontal bars; 100 μM, dotted bars; 1 mM, crossed bars) that were applied to the cells 5 min prior to the

CCK-8 stimulus. Amylase activity is expressed as a percentage of total amylase content at the beginning of the incubation. *Inset:* effect of melatonin (1 μM–1 mM) on amylase release. Results are the mean ± SEM (*n*=7–12 experiments; **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 compared with CCK-8 alone)

because the dose–response curve to the CCK-8 did not shift.

Changes in [Ca²⁺]_c in response to CCK-8 and effects of melatonin

Throughout the following determinations, we chose the concentration of 1 mM melatonin, a concentration that has shown clear effects in previous studies [6, 9]. Stimulation of fura-2-loaded cells with 1 nM CCK-8, in the presence of extracellular Ca²⁺ (1 mM), led to an initial increase in [Ca²⁺]_c, followed by a decrease towards a plateau over the pre-stimulation level (*n*=5 experiments/86 total cells studied; Fig. 2, continuous line). The total Ca²⁺ mobilization and the time-course of changes of the Ca²⁺ signal were analysed, and the values obtained are shown in Table 1.

When pancreatic acinar cells were stimulated with 1 nM CCK-8 after 5 min incubation with 1 mM melatonin, we observed that (1) the peak of [Ca²⁺]_c induced by CCK-8 was smaller, (2) the decay constant of [Ca²⁺]_c to

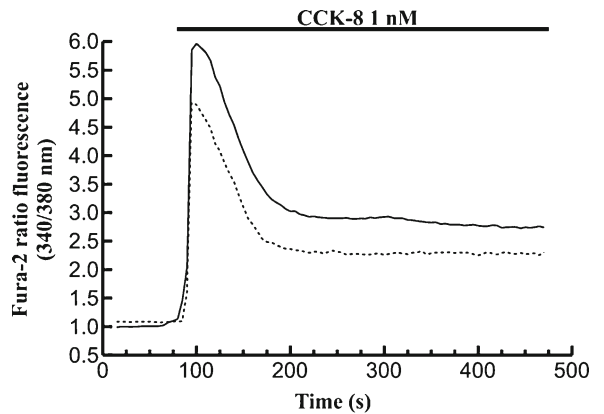


Fig. 2 Changes in [Ca²⁺]_c in response to cholecystikinin (CCK)-8. Time-course of changes in [Ca²⁺]_c in fura-2-loaded mouse pancreatic acinar cells stimulated with 1 nM CCK-8 alone (solid line) or after pre-incubation of cells with 1 mM melatonin (dotted line). The horizontal bar indicates the time during which CCK-8 was applied to the cells. The traces shown are typical of five to nine independent experiments

Table 1 Changes in $[Ca^{2+}]_c$ in response to CCK-8 and the effects of melatonin

	Ca^{2+} in the medium	Peak $[Ca^{2+}]_c$ (u.f.)	Steady state $[Ca^{2+}]_c$ (u.f.)	Rate of $[Ca^{2+}]_c$ decay (u.f.)	Integrated response (total Ca^{2+} ; u.f.)
CCK-8 ($n=5$ exp./86 cells)	Yes	5.48±0.52	2.71±0.22	0.021±0.004	668.90±79.28
CCK-8 plus melatonin 1 mM ($n=9$ exp./230 cells)	Yes	4.91±0.25	2.13±0.08*	0.026±0.001	463.30±16.99**
CCK-8 ($n=8$ exp./112 cells)	No	4.21±0.47	1.72±0.16**	0.018±0.003	395.80±51.35*
CCK-8 plus melatonin 1 mM ($n=5$ exp./83 cells)	No	4.18±0.33	1.45±0.13	0.016±0.002	329.70±37.61

Data are the mean ± SEM in units of fluorescence of n experiments. Mouse pancreatic acinar cells were stimulated with 1 nM CCK-8 alone or after pre-treatment of cells with 1 mM melatonin. Experiments were performed in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} , as indicated (u.f., units of fluorescence normalized to basal)

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ (compared with CCK-8 alone in the presence of extracellular Ca^{2+})

the basal value was slightly increased and (3) $[Ca^{2+}]_c$ reached a slightly lower steady state value ($n=9$ experiments/230 total cells studied; Fig. 2, dotted line). We found that the total Ca^{2+} mobilization evoked by CCK-8 in the presence of melatonin was significantly decreased, compared to that induced by CCK-8 alone ($P<0.01$; Table 1). This is the result of considering together a smaller peak of $[Ca^{2+}]_c$, plus a slightly increased decay $[Ca^{2+}]_c$, plus a slightly lower steady state value of $[Ca^{2+}]_c$, which were obtained after stimulation of cells with CCK-8 in the presence of melatonin, compared to the responses induced by CCK-8 alone.

Additionally, we analysed the effect of the indole on CCK-8-evoked Ca^{2+} signals in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (medium containing 0.5 mM EGTA). Under these conditions, stimulation of cells with 1 nM CCK-8 led to a transient change in $[Ca^{2+}]_c$ (the values for the variables studied can be seen in Table 1).

Similar to the results observed in the presence of extracellular Ca^{2+} , pre-incubation of pancreatic acinar cells for 5 min in the presence of melatonin, and in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium, led to a smaller mobilization of Ca^{2+} in response to CCK-8 (Table 1).

It is worth to note that, in this set of experiments, Ca^{2+} responses were smaller compared to those observed when Ca^{2+} was present in the extracellular medium, both in the CCK-8 and CCK-8 plus melatonin set of experiments. This indicates that Ca^{2+} entry from the extracellular space, when available, contributes to CCK-8-evoked signals.

At this point, we could relate the smaller CCK-8-evoked Ca^{2+} responses observed in the presence of melatonin to a smaller Ca^{2+} mobilization from intracellular

stores by CCK-8 because extracellular Ca^{2+} was not available in order to contribute to CCK-8-induced cytosolic Ca^{2+} signals, either in the presence or in the absence of melatonin.

We also evaluated the effect of melatonin on Ca^{2+} signals evoked by a physiological concentration of CCK-8 (20 pM). Perfusion of cells with 20 pM CCK-8 induced an oscillatory pattern of $[Ca^{2+}]_c$ ($n=3$ experiments/41 total cells studied; Fig. 3a). This pattern of changes in $[Ca^{2+}]_c$ has been previously observed in the exocrine pancreas [7, 8, 11]. The mean calculated amplitude of $[Ca^{2+}]_c$ oscillations evoked by CCK-8 was $1.43±0.15$ a.u. of fluorescence.

Incubation of pancreatic acinar cells with melatonin (1 mM), in the presence of CCK-8 20 pM, induced a decrease in the amplitude of $[Ca^{2+}]_c$ responses evoked by CCK-8 ($n=5$ experiments/84 total cells studied; Fig. 3b). Upon removal of melatonin, $[Ca^{2+}]_c$ returned to the oscillatory pattern induced by CCK-8. The mean calculated amplitude of $[Ca^{2+}]_c$ oscillations induced by CCK-8 in the presence of melatonin was $0.80±0.19$ a.u. of fluorescence ($P<0.05$ vs. CCK-8 alone, data given above).

In another set of experiments, cells were stimulated with 20 pM CCK-8 following previous incubation of cells with melatonin (1 mM). Melatonin did not block CCK-8-evoked changes in $[Ca^{2+}]_c$. Nevertheless, upon removal of melatonin from the extracellular medium, we observed an increase in the amplitude of CCK-8-evoked oscillations in $[Ca^{2+}]_c$, similarly to what has been shown above ($n=6$ experiments/119 total cells studied; Fig. 3c). The mean calculated amplitude of $[Ca^{2+}]_c$ oscillations induced by CCK-8 in the presence of melatonin was $0.80±0.18$ a.u.

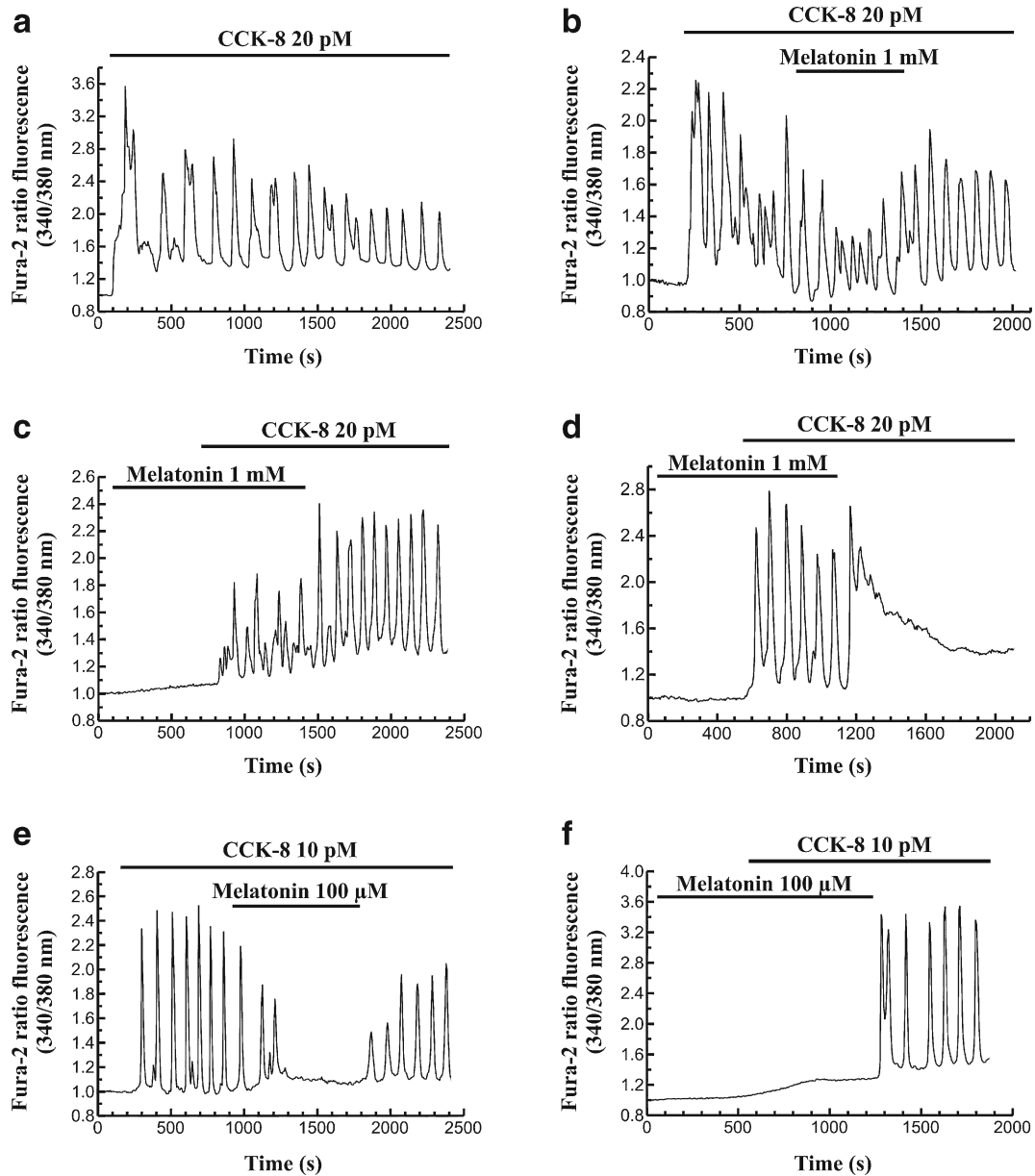


Fig. 3 Effect of melatonin on Ca^{2+} responses induced by a physiological concentration of CCK-8. **a** Time-course of changes in $[Ca^{2+}]_c$ in pancreatic acinar cells stimulated with 20 pM CCK-8. **b** Cells were perfused with 20 pM CCK-8 for 10 min, and then 1 mM melatonin was included in the perfusion medium, during ten additional minutes. Afterwards, melatonin was removed from the extracellular solution, and cells were stimulated for ten additional minutes with CCK-8 (20 pM) alone. **c, d** Cells were perfused with 1 mM melatonin for 10 min. Thereafter, CCK-8 (20 pM) was included in the extracellular solution and was maintained together with melatonin during 10–12 min. Thereafter, melatonin was removed from the extracellular solution, and cells were stimulated with CCK-8 alone for 15–18 additional

minutes. **e** Cells were perfused with 10 pM CCK-8 for 15 min, and then 100 μ M melatonin was included in the perfusion medium during 15 additional minutes. Afterwards, melatonin was removed from the extracellular solution, and cells were stimulated for ten additional minutes with CCK-8 (10 pM) alone. **f** Cells were perfused with 100 μ M melatonin for 10 min. Then, CCK-8 (10 pM) was included in the perfusion medium and was maintained for ten additional minutes, in addition to melatonin. Finally, melatonin was removed from the extracellular solution, and cells were stimulated for ten additional minutes with CCK-8 alone. The horizontal bars indicate the time during which CCK-8 and melatonin were applied to the cells. The traces are typical of three to nine independent experiments

of fluorescence ($P < 0.01$ vs. CCK-8 alone, 1.31 ± 0.09 a.u. of fluorescence). Additionally, the frequency of Ca^{2+} spikes increased from 0.75 ± 0.14 spikes/100 s, observed in the presence of CCK-8 plus melatonin, up to 1.50 ± 0.10 spikes/100 s that were observed in the presence of CCK-8 and after removal of melatonin ($P < 0.01$). In some experiments, after removal of melatonin, we could even observe a sustained response of $[\text{Ca}^{2+}]_c$, instead of the oscillatory pattern expected to appear in response to CCK-8 20 pM (Fig. 3d).

Furthermore, when pancreatic acinar cells were stimulated with a lower concentration of CCK-8 (10 pM), the inhibitory action of melatonin on CCK-8-evoked Ca^{2+} signals was more evident. Under these conditions, the oscillatory pattern of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induced by CCK-8 10 pM was abolished when melatonin (we employed 100 μM this time) was added to the cells. After removal of melatonin, the oscillatory pattern of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mobilization in response to CCK-8 was restored (Fig. 3e). In addition, the previous incubation of cells in the presence of melatonin blocked oscillations in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ when CCK-8 10 pM was added to the cells. Now it was observed a slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ that reached a plateau. After removal of melatonin from the perfusion medium, the expected oscillatory pattern of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in response to CCK-8 (10 nM) was observed (Fig. 3f).

These results support a reduction, or even an inhibition (depending on the concentration of CCK-8 employed), of CCK-8-induced Ca^{2+} mobilization in the presence of melatonin.

Effect of melatonin on CCK-8-evoked Ca^{2+} influx

The level of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ achieved in response to Ca^{2+} -mobilizing agonists depends on Ca^{2+} release from intracellular stores and also depends on Ca^{2+} entry from the extracellular space [25, 30]. In this line, our results indicate that Ca^{2+} entry from the extracellular space, when available, contributes to CCK-8 evoked Ca^{2+} signals. Thus, it was interesting to evaluate whether Ca^{2+} influx was affected in the presence of melatonin because CCK-8-evoked enzyme secretion highly depends on the level of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ reached in response to agonists [33–35].

Stimulation of cells with 1 nM CCK-8 in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing 0.5 mM EGTA) led to a transient change in $[\text{Ca}^{2+}]_c$, as a consequence of its release from internal Ca^{2+} stores. Subsequent addition of CaCl_2 (1 mM) to the external medium resulted in a sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$,

indicative of store-operated Ca^{2+} entry into the cells. The time-course of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ under these conditions can be seen in Fig. 4 (continuous line).

Moreover, pancreatic acinar cells were pre-incubated for 5 min in the presence of 1 mM melatonin, and in the absence of extracellular Ca^{2+} , and then were stimulated with 1 nM CCK-8. Upon inclusion of Ca^{2+} in the extracellular medium, Ca^{2+} entry was observed. Under these conditions, the responses obtained did not differ from those observed in the presence of CCK-8 alone (Table 2 and Fig. 4, dotted line).

These data suggest that the smaller Ca^{2+} responses evoked by CCK-8 in the presence of melatonin cannot be explained by a reduction in Ca^{2+} influx from the extracellular space, and are rather related to a smaller Ca^{2+} release from cytosolic stores in response to CCK-8.

Effects of CCK-8 and melatonin on cell viability

Finally, we evaluated whether the treatment of cells with melatonin has any effect on cell viability. Different batches of cells were incubated for 24–72 h in the presence of no stimulus (control cells), 1 nM

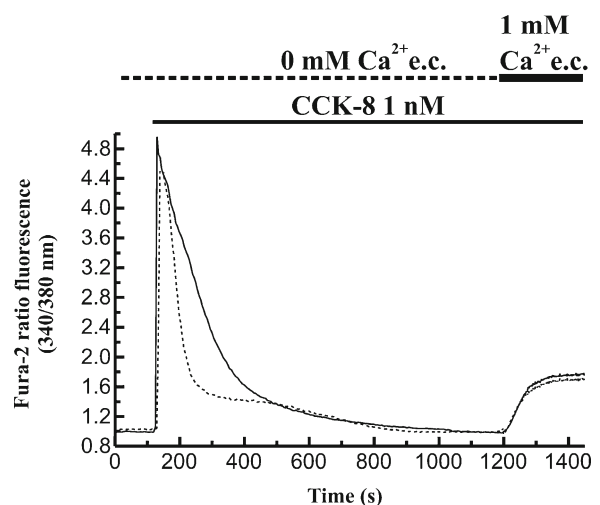


Fig. 4 Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in response to cholecystokinin (CCK)-8 in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium and stimulated Ca^{2+} influx in mouse pancreatic acinar cells. Cells were stimulated in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (0.5 mM EGTA) with 1 nM CCK-8 alone (*continuous line*) or after pre-incubation for 5 min with 1 mM melatonin (*dotted line*). At the desired time point, 1 mM CaCl_2 was added. Horizontal bars show the time during which the Ca^{2+} -free medium, CCK-8 or 1 mM extracellular Ca^{2+} were added to the cells. The traces shown are typical of five to nine independent experiments

Table 2 Effect of melatonin on CCK-8-evoked Ca^{2+} influx

	Rate of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ rise (u.f.)	Amount of Ca^{2+} entry (u.f.)	Plateau of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (u.f.)
CCK-8 ($n=8$ exp./103 cells)	0.0059±0.0015	43.28±1.79	1.86±0.17
CCK-8 plus melatonin 1 mM ($n=5$ exp./66 cells)	0.0068±0.0018	45.05±4.38	1.72±0.18

Data are the mean±SEM in units of fluorescence of n experiments. Mouse pancreatic acinar cells were stimulated with 1 nM CCK-8 alone or after pre-treatment of cells with 1 mM melatonin, in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (0.5 mM EGTA). At the desired time point, 1 mM CaCl_2 was added to the perfusion medium, and Ca^{2+} influx was analysed (u.f., units of fluorescence normalized to basal)

CCK-8 or 1 mM melatonin. As a negative control, cells were incubated in the presence of 100 μM H_2O_2 .

Viability of cells did not change significantly in the presence of either CCK-8 (92.53±9.94 %, $n=4$) or melatonin (108.01±8.12, $n=4$), compared to control (non-stimulated) cells, considered 100 %. However, cell survival dropped by a 74.6 % after 72 h of incubation of mouse pancreatic acinar cells in the presence of 100 μM H_2O_2 , an oxidant with negative effects on cell viability. In the presence of melatonin, the effect of H_2O_2 on cell viability was reduced (Fig. 5).

These data show that cell viability is not changed by melatonin; furthermore, our results show that melatonin reduces the toxic effects of H_2O_2 on pancreatic acinar cells.

Discussion

In the present study, we show that melatonin reduces CCK-8-evoked amylase release by pancreatic acinar cells. This effect is probably due to a smaller Ca^{2+} mobilization from intracellular stores in response to CCK-8 in the presence of the indoleamine. From this point of view, it is reliable that melatonin exerts a direct regulatory action on the physiology of the exocrine pancreas.

Intracellular Ca^{2+} signalling remains at the centre of stimulus secretion coupling in the exocrine pancreas. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ has precise temporal and spatial characteristics, which is the result of a rigorous regulation of Ca^{2+} homeostasis. Basically, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ increases due to Ca^{2+} release from intracellular stores and by the activation of Ca^{2+} entry from the extracellular space [34, 36].

We have observed that, in the presence of melatonin, the total Ca^{2+} mobilization in response to CCK-8 is reduced. This effect could be explained by a reduced Ca^{2+} mobilization from intracellular stores, by a reduced Ca^{2+} entry from the extracellular medium, or both.

The analysis of our results shows that Ca^{2+} influx was not affected in the presence of melatonin. Thus, the effect of melatonin on the total Ca^{2+} mobilization in response to CCK-8 can be explained by a reduction of Ca^{2+} release from the intracellular stores.

Additional experiments that we have performed support this observation. The effect of melatonin on Ca^{2+} mobilization was more evident at concentrations of CCK-8 falling within the physiological range (i.e. picomolar), which evoked an oscillatory pattern in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ that was blocked in the presence of melatonin.

The major role of the exocrine pancreas is the secretion of digestive enzymes. In this line, amylase secretion is achieved at the expense of an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [33–35]. Given that CCK-8-induced Ca^{2+} mobilization was smaller in the presence of melatonin, it should

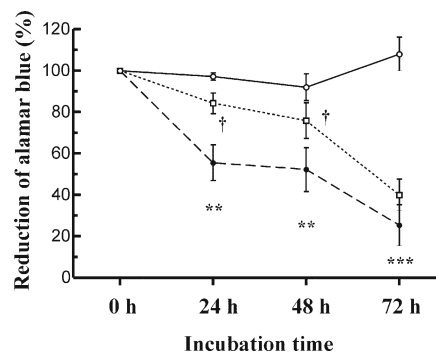


Fig. 5 Analysis of viability of mouse pancreatic acinar cells. Cell proliferation and cytotoxicity were analysed studying AlamarBlue® reduction by viable cells, as described in “Materials and methods” section. Incubation of cells in the presence of 1 mM melatonin did not significantly alter cell viability (continuous line, open circles). However, incubation of cells with 100 μM H_2O_2 (dashed line, closed circles) led to a decrease in cell viability compared to non-stimulated cells. In the presence of melatonin (1 mM), the H_2O_2 -evoked effect was significantly reduced (dotted line, open squares). Graphics are representative of four independent experiments (** $P<0.01$; *** $P<0.001$ for H_2O_2 treatment vs. non-stimulated cells. † $P<0.05$, melatonin plus H_2O_2 vs. H_2O_2 alone)

be expected a lower amylase release, as we have observed.

Exocrine pancreatic secretion is sensitive to antioxidants. We have previously shown that cinnamtannin B-1, a polyphenol, modulates amylase release in response to CCK-8 [27]. In addition, it has been shown that intraduodenal administration of melatonin to rats produced a dose-dependent stimulation of pancreatic enzyme secretion [16, 19].

However, the effects of melatonin *in vitro* cannot be directly compared to the *in vivo* studies. Isolated pancreatic acini can be a useful model to investigate the direct effects of certain drugs, whereas *in vivo*, there are numerous indirect mechanisms involved in the regulation of pancreatic enzyme secretion. In the animal model described by Jaworek's group, melatonin (at low doses) strongly stimulated pancreatic enzyme secretion via activation of sensory nerves, and by CCK release from the gut, which turned on an entero-pancreatic reflex (i.e. melatonin exerted indirect effects).

Additionally, we cannot exclude that melatonin might behave differently when acting at physiological or pharmacological concentrations.

Our results also show that melatonin did not stimulate amylase release at any of the concentrations tested. In this sense, our results are in agreement to previous observations [16, 17, 19], who showed that enzyme secretion from isolated pancreatic acini was not significantly affected by melatonin or *L*-tryptophan.

Finally, we have shown that cell viability was not altered by melatonin treatment; furthermore, the indole reduced the toxic effects of H₂O₂ on acinar cells, which supports a protective role for melatonin [18].

Interestingly, melatonin reduced Ca²⁺ mobilization in response to a supraphysiological concentration of CCK. This concentration is not normally reached under physiological conditions. However, it could be found under pathological conditions that could lead to overstimulation of the gland and a concomitant pancreatitis. This is in agreement to the pancreatoprotector role of melatonin [18, 20, 21].

Additionally, our results support a recent report by Huai et al. [15], who have shown that the protective effects of melatonin in the pancreas may involve the up-regulation of SERCA and Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression. However, the changes in [Ca²⁺]_c in response to secretagogues were not thoroughly studied in their work.

The effects of melatonin on CCK-8-induced responses that we have observed could be responsible for a pancreatic protection afforded by melatonin. It is likely that changes in Ca²⁺ signalling evoked by CCK-8 in the presence of melatonin (which are not related to decline of Ca²⁺ influx from the extracellular pool) could be explained not only by a reduction of Ca²⁺ release from intracellular stores but also by a modulation of sarcoplasmic pump activity by this indole. A lower Ca²⁺ mobilization in the presence of melatonin, together with a more efficient transport of Ca²⁺ across cell membranes, can alleviate Ca²⁺ overload in pancreatic acinar cell. The latter effect of melatonin could be matter for a future study.

It is noteworthy that the doses of melatonin used in this study are higher than those found normally in blood. Under physiological conditions, the blood level of melatonin achieved at night is 100–150 pg/ml, and 6–60 pg/ml through the day.

The concentrations of melatonin that we have used are higher than those found in blood, and could be therefore considered rather pharmacological than physiological. Nevertheless, *in vivo* melatonin levels are not in equilibrium among different fluids or cellular organelles. For example, many tissues synthesize melatonin for their local use, e.g. as an autocrine or paracrine agent. Also, some fluids, e.g. bile or cerebrospinal fluid, have concentrations of melatonin that are orders of magnitude higher than those in the blood. Thus, in general, blood levels of melatonin cannot be used to define physiological concentrations because the local concentrations of melatonin remain undefined.

In summary, our findings show that melatonin modulates Ca²⁺ signals and amylase release evoked by CCK-8. These are signs that could support a fine-tuning action of the indole on exocrine pancreatic function.

Acknowledgements The authors declare that there is no conflict of interest. This work was supported by Junta de Extremadura-FEDER (GR10010). Patricia Santofimia-Castaño was granted a fellowship from Junta de Extremadura (Consejería de Economía, Comercio e Innovación) and European Social Fund. The authors would like to thank Mrs. Mercedes Gomez Blázquez for her excellent technical support.

Author contributions Patricia Santofimia-Castaño performed data acquisition and analysis. Deborah Clea Ruy is responsible for acquisition of data. Ginés M. Salido performed data interpretation and critical revision of the manuscript. Antonio González is responsible for concept/design of the research, data analysis/interpretation, drafting and approval of the manuscript.

References

- Aust S, Jäger W, Kirschner H, Klimpfänger M, Thalhammer T (2008) Pancreatic stellate/myofibroblast cells express G-protein-coupled melatonin receptor 1. *Wien Med Wochenschr* 158:575–578
- Bähr I, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E (2012) Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the $G\alpha_q$ protein-coupled and PI3K signaling pathways. *J Pineal Res* 53:390–398
- Carafoli E (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 71:129–153
- Çöl C, Dımler K, Hasdemir O, Büyükaşık O, Firat T, Kükner A (2010) Evaluation of the effects of melatonin administration intraperitoneally on rats with acute pancreatitis induced by ductal ligation. *Turk J Gastroenterol* 21:433–438
- Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, Tresguerres JA (2011) Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mech Ageing Dev* 132:573–582
- Del Castillo-Vaquero A, Salido GM, González A (2010) Melatonin induces calcium release from CCK-8- and thapsigargin-sensitive cytosolic stores in pancreatic AR42J cells. *J Pineal Res* 49:256–263
- Fernández-Sánchez M, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, González A (2009) Ethanol exerts dual effects on calcium homeostasis in CCK-8-stimulated mouse pancreatic acinar cells. *BMC Cell Biol* 10:77
- González A, Camello PJ, Pariente JA, Salido GM (1997) Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun* 230:652–656
- González A, del Castillo-Vaquero A, Miró-Morán A, Tapia JA, Salido GM (2011) Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J Pineal Res* 50:250–260
- González A, Salido GM (2010) Participation of mitochondria in calcium signalling in the exocrine pancreas. *J Physiol Biochem* 57:331–339
- González A, Schmid A, Sternfeld L, Krause E, Salido GM, Schulz I (1999) Cholecystokinin-evoked Ca^{2+} waves in isolated mouse pancreatic acinar cells are modulated by activation of cytosolic phospholipase A_2 , phospholipase D, and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 261:726–733
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
- Gülben K, Ozdemir H, Berberoğlu U, Mersin H, Yrkin F, Cakır E, Aksaray S (2010) Melatonin modulates the severity of taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 55:941–946
- Habara Y, Kanno T (1994) Stimulus-secretion coupling and Ca^{2+} dynamics in pancreatic acinar cells. *Gen Pharmacol* 25:843–850
- Huai J, Shao Y, Sun X, Jin Y, Wu J, Huang Z (2012) Melatonin ameliorates acute necrotizing pancreatitis by the regulation of cytosolic Ca^{2+} homeostasis. *Pancreatol* 12:257–263
- Jaworek J (2006) Ghrelin and melatonin in the regulation of pancreatic exocrine secretion and maintaining of integrity. *J Physiol Pharmacol* 57:83–96
- Jaworek J, Nawrot K, Konturek SJ, Leja-Szpak A, Thor P, Pawlik WW (2004) Melatonin and its precursor, L-tryptophan: influence on pancreatic amylase secretion in vivo and in vitro. *J Pineal Res* 36:155–164
- Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Szklarczyk J, Kot M, Konturek SJ, Pawlik WW (2007) Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol* 58:65–80
- Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Konturek SJ (2010) Brain-gut axis in the modulation of pancreatic enzyme secretion. *J Physiol Pharmacol* 61:523–531
- Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T, Konturek SJ (2003) Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 34:40–52
- Jaworek J, Zwirska-Korcza K, Szklarczyk J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Jaworek AK, Tomaszewska R (2010) Pinealectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacol Rep* 62:864–873
- Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD (1982) Interactions of COOH-terminal fragments of cholecystokinin with receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 257:5554–5559
- Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ (2010) Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 49:248–255
- Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túnez I, Montilla P, Pera C, Muntané J (2006) Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 40:195–203
- Putney JW (1988) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1–12
- Qi W, Tan DX, Reiter RJ, Kim SJ, Manchester LC, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC (1999) Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 44:2257–2262
- Rivera-Barreno R, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, González A (2010) Effect of cinnamtannin B-1 on cholecystokinin-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:980–988
- Ruiz-Rabelo J, Vázquez R, Arjona A, Perea D, Montilla P, Túnez I, Muntané J, Padillo J (2011) Improvement of capecitabine antitumoral activity by melatonin in pancreatic cancer. *Pancreas* 40:410–414
- Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E (2011) A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 51:17–43
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67–69
- Stumpf I, Mühlbauer E, Peschke E (2008) Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45:318–327

32. Thomas RP, Hellmich MR, Townsend CM Jr, Evers BM (2003) Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. *Endocr Rev* 24:571–599
33. Williams JA (2006) Regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterol* 22:498–504
34. Williams JA (2010) Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol* 26:478–483
35. Williams JA, Burnham DB, Hootman SR (1989) The gastrointestinal system. Salivary, gastric, pancreatic and hepatobiliary secretion. In: Schultz SG, Forte JG, Rauner BB (eds) *Handbook of physiology*, Vol. III, Section 6. American Physiological Society, Bethesda, pp 419–441
36. Yule DI (2010) Pancreatic acinar cells: molecular insight from studies of signal-transduction using transgenic animals. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1757–1761

Pharmacological dose of melatonin reduces cytosolic calcium load in response to cholecystokinin in mouse pancreatic acinar cells

Patricia Santofimia-Castaño · Deborah Clea Ruy · Miguel Fernandez-Bermejo · Gines M. Salido · Antonio Gonzalez

Received: 31 March 2014 / Accepted: 24 July 2014 / Published online: 2 August 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Intracellular Ca^{2+} overload has been considered a common pathological precursor of pancreatic injury. In this study, the effects of melatonin on Ca^{2+} mobilization induced by cholecystokinin octapeptide (CCK-8) in freshly isolated mouse pancreatic acinar cells have been examined. Changes in intracellular free Ca^{2+} concentration were followed by single cell fluorimetry. For this purpose, cells were loaded with the Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye fura-2-acetoxymethyl ester. In order to evaluate the contribution of Ca^{2+} transport at the plasma membrane, at the endoplasmic reticulum (ER) or at the mitochondria, cells were incubated with CCK-8 alone or in combination with LaCl_3 , thapsigargin (Tps), or FCCP to, respectively, uncouple Ca^{2+} transport at these localizations. The experiments were performed in the absence or in the presence of melatonin in combination with the stimuli mentioned. Our results show that the total Ca^{2+} mobilization evoked by CCK-8 was attenuated by a 30 % in the presence of 100 μM melatonin compared with the responses induced by CCK-8 alone. Upon inhibition of Ca^{2+} transport into the ER by Tps, Ca^{2+} mobilization was also reduced in the presence of melato-

nin. In the presence of LaCl_3 plus melatonin, the total Ca^{2+} mobilization induced by CCK-8 was significantly decreased, compared with the response obtained without melatonin but in the presence of LaCl_3 . No major differences were found when the cells were incubated with CCK-8 or Tps alone or in combination with LaCl_3 plus melatonin and FCCP, compared with the responses obtained in the absence of FCCP. The initial Ca^{2+} release from intracellular stores evoked by CCK-8 or Tps was not significantly reduced in the presence of melatonin. The effect of melatonin could be explained on the basis of a stimulated Ca^{2+} transport out of the cell through the plasma membrane and by a stimulation of Ca^{2+} reuptake into the ER. Accumulation of Ca^{2+} into mitochondria might not be a major mechanism stimulated by melatonin. We conclude that melatonin alleviates intracellular Ca^{2+} accumulation, a situation potentially leading to cell damage in the exocrine pancreas.

Keywords Melatonin · Calcium · Cholecystokinin · Ion transport · Pancreas

Abbreviations

CCK-8	Cholecystokinin octapeptide
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	Intracellular free Ca^{2+} concentration
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FCCP	Carbonyl cyanide <i>p</i> -trifluoromethoxy-phenylhydrazone
Fura-2/AM	Fura-2 acetoxymethyl ester
LaCl_3	Lanthanum chloride
PMCA	Plasma membrane calcium ATPase
SERCA	Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
Tps	Thapsigargin

P. Santofimia-Castaño · G. M. Salido · A. Gonzalez (✉)
Department of Physiology (Cell Physiology Research Group),
University of Extremadura, Avenida Universidad s/n,
10003 Cáceres, Spain
e-mail: agmateos@unex.es

D. C. Ruy
Faculdade de Agronomia & Medicina Veterinária, Universidade
de Brasília, 70900-100 Brasília, DF, Brazil

M. Fernandez-Bermejo
Department of Gastroenterology, San Pedro de Alcantara
Hospital, 10003 Cáceres, Spain

Introduction

Ca^{2+} homeostasis plays a pivotal role in controlling pancreatic acinar cells' physiology and pathology. The onset of Ca^{2+} signals in pancreatic acinar cells in response to its agonists is achieved by coordinated mechanisms which involve Ca^{2+} release from intracellular stores [1], Ca^{2+} entry from the extracellular space [2] and Ca^{2+} transport across the cell membranes [3]. Resting cytosolic-free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) must be restored following its increase in response to agonists. The return of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ to the prestimulation level is the result of a cooperation between Ca^{2+} extrusion across the plasma membrane toward the extracellular medium [3] and Ca^{2+} uptake into intracellular organelles [4].

However, abnormal cytosolic Ca^{2+} signals can lead to sustained changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and to its accumulation within the cell [5]. This situation can be generated by an excessive release of Ca^{2+} through specific channels, by an increased entry of Ca^{2+} from the extracellular space into the cell, and/or by the inhibition of Ca^{2+} transport pumps located at the membrane of intracellular stores or at the plasma membrane [5, 6]. All these mechanisms together may contribute to a cytosolic Ca^{2+} overload, which can be detrimental and induce cell damage.

The function of the exocrine pancreas is regulated by different peptides and neurotransmitters [7, 8]. However, despite its physiological role, overstimulation by secretagogues can induce damage to the pancreas and lead to dysfunction of the gland [9, 10].

Nowadays, there is an increasing interest in the protective role of melatonin in cellular physiology. This indoleamine is involved in the regulation of multiple functions, including the control of the gastrointestinal system [11, 12]. Evidence has been provided of the expression of melatonin receptors types 1 (MT1) and 2 (MT2) in the pancreas [13, 14]. In general, it has been proposed that melatonin exerts a regulatory and antioxidant function, in addition to an antitumor effect. Melatonin plays a protective role against pancreatitis [15–18], and prevents acinar cell degeneration and apoptosis [19]. Melatonin also reduces cell death induced by oxidative stress after ischemia/reperfusion injury in the pancreas [16, 20]. Conversely, melatonin induces cell death in pancreatic cancer cells, as for example, PANC-1 cells [21], AR42J cells, [13] and pancreatic rat insulinoma β -cells [22].

It is well known that most cellular activity of the exocrine pancreas is initiated by changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$, and that major physiological processes occur downstream to Ca^{2+} mobilization [23]. A recent report has shown that melatonin induces up-regulation of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger

expression in the exocrine pancreas [24]. Additionally, recent evidence shows that Ca^{2+} mobilization and the resulting amylase release evoked by cholecystokinin in mouse pancreatic acinar cells are smaller in the presence of melatonin [25]. These observations suggest that the regulation of Ca^{2+} signaling by melatonin may be involved among its potential protective effects in the exocrine pancreas. Nevertheless, the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in response to secretagogues were not thoroughly analyzed in these recent studies. Therefore, the actions of melatonin on intracellular Ca^{2+} homeostasis need further characterization.

In the present study, the effects of melatonin on Ca^{2+} homeostasis in mouse pancreatic acinar cells stimulated with a potentially damaging concentration of CCK-8 have been investigated. Our objective was to shed more light on the mechanisms involved in the protective action of melatonin on the exocrine pancreatic function.

Materials and methods

Animals and chemicals

Adult male Swiss mice weighing between 25 and 30 g were used for this study. Mice were obtained from the animal house of the University of Extremadura. Animals were humanely handled and sacrificed in accordance to the institutional Bioethical Committee. Collagenase CLSPA was obtained from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, U.S.A.). Carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP), (Tyr[SO_3H] 27) cholecystokinin fragment 26–33 amide (CCK-8), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), melatonin, and thapsigargin (Tps) were obtained from Sigma Chemicals Co. (Madrid, Spain). Fura-2-AM was obtained from Invitrogen (Europe). All other analytical grade chemicals used were obtained from Sigma Chemicals Co. (Spain).

Preparation of isolated pancreatic acinar cells

A suspension of mouse pancreatic single cells and small acini was prepared following a previously described method [26]. Briefly, after sacrificing the animal, the pancreas was rapidly removed and placed in a physiological Na-HEPES solution containing: 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES, 0.01 % trypsin inhibitor (soybean), and 0.2 % bovine serum albumin (pH = 7.4, adjusted with NaOH). This buffer was supplemented with collagenase (100 U/mL). The tissue was incubated in this solution for 10 min at 37 °C. The enzymatic digestion of the tissue was

followed by gently pipetting the suspension through tips of decreasing diameter for mechanical dissociation of the cells. After centrifugation (5 min at $30\times g$), cells were resuspended in Na-HEPES buffer without collagenase. Cell viability was not significantly changed by the isolation procedure, as assayed by trypan blue exclusion test, and was greater than 95 %. Experiments were performed at room temperature (23–25 °C), and different batches of cells were used for the studies.

Dye loading and determination of $[Ca^{2+}]_c$

Freshly isolated mouse pancreatic acinar cells, resuspended in Na-HEPES buffer, were loaded with fura-2-acetoxymethyl ester (fura-2/AM, 4 μ M) at room temperature (23–25 °C) for 40 min as previously described [27]. Afterward, cells were centrifuged and resuspended in Na-HEPES buffer without trypsin inhibitor and bovine serum albumin. After loading with fura-2/AM, cells were kept at 4 °C until use, and the experiments were performed within the next 4 h.

For the detection of changes in $[Ca^{2+}]_c$, small aliquots of dye-loaded cells were transferred to a coverslip mounted on an experimental perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Diaphot T200, Melville, NY, USA). The cells were continuously superfused with a control Na-HEPES buffer containing (in mM): 140 NaCl, 4.7 KCl, 1 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 10 Hepes, 10 glucose (pH adjusted to 7.4).

Fura-2 fluorescence was detected employing an image acquisition system (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Cells were excited alternatively at 340/380 nm, with light from a xenon arc lamp passed through a high-speed monochromator (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Fluorescence emission at 505 nm was monitored using a cooled digital CCD camera (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu, Japan) and recorded using dedicated software (Aquacosmos 2.5, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Fura-2-emitted fluorescence closely reflects changes in $[Ca^{2+}]_c$ [28]. Results are expressed as the mean ratio of fluorescence changes (u. f.) emitted at both excitation wavelengths (previously normalized to the resting fluorescence) \pm SEM, n (where n is the number of independent experiments). All fluorescence measurements were made from areas considered individual cells.

For the analysis of the effects of melatonin on CCK-8-induced changes in $[Ca^{2+}]_c$ we calculated (1) the peak $[Ca^{2+}]_c$ response (calculated as the maximal value of fluorescence obtained after stimulation of cells with the agonist); (2) a “steady-state level” (calculated 5 min after application of the stimulus); (3) the total Ca^{2+} mobilization (estimated as the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ over the basal during 5 min after application of the stimulus); and

(4) the rate of decay of $[Ca^{2+}]_c$ to basal values, which was calculated using the constant of the exponential decay. Traces were fitted to the equation

$$y = A \times e^{-Kx} + \text{plateau},$$

where K is the constant of the exponential decay, x is the time, and A is the span.

In the experiments where Ca^{2+} free medium was employed, Ca^{2+} was omitted from the extracellular solution, and 250 μ M EGTA was added to the medium, whereas in the experiments in which the effect of La^{3+} was tested, neither Ca^{2+} nor EGTA was added to the extracellular solution.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test, and only P values <0.05 were considered statistically significant. For individual comparisons and statistics between individual treatments, we employed Student's t test, and only P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Changes in $[Ca^{2+}]_c$ in response to CCK-8 and effect of melatonin

Stimulation of pancreatic acinar cells with 1 nM CCK-8, in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium, induced an initial increase in $[Ca^{2+}]_c$ that was followed by a decrease toward a plateau value (steady-state) over the prestimulation level (Fig. 1a; open circles). To investigate the effects of melatonin on Ca^{2+} homeostasis, cells were preincubated for 5 min in the presence of 100 μ M melatonin (Fig. 1a; full circles). This is a concentration of melatonin and incubation time that we have employed in previous studies, and has exhibited clear effects on cell physiology [25, 29].

When pancreatic acinar cells were stimulated with CCK-8 in the presence of melatonin, the total Ca^{2+} mobilization observed was significantly decreased, compared with that obtained when the cells were stimulated with CCK-8 alone ($P < 0.01$; Fig. 1b). We did not observe differences in the peak of $[Ca^{2+}]_c$ reached in the presence of melatonin, compared with that obtained in response to CCK-8 alone (Fig. 1c). The decay of $[Ca^{2+}]_c$ toward the basal value was increased ($P < 0.05$; Fig. 1d), and the level of $[Ca^{2+}]_c$ reached a significantly lower steady-state value, in comparison with that found when the cells were stimulated with CCK-8 alone ($P < 0.05$; Fig. 1e). When

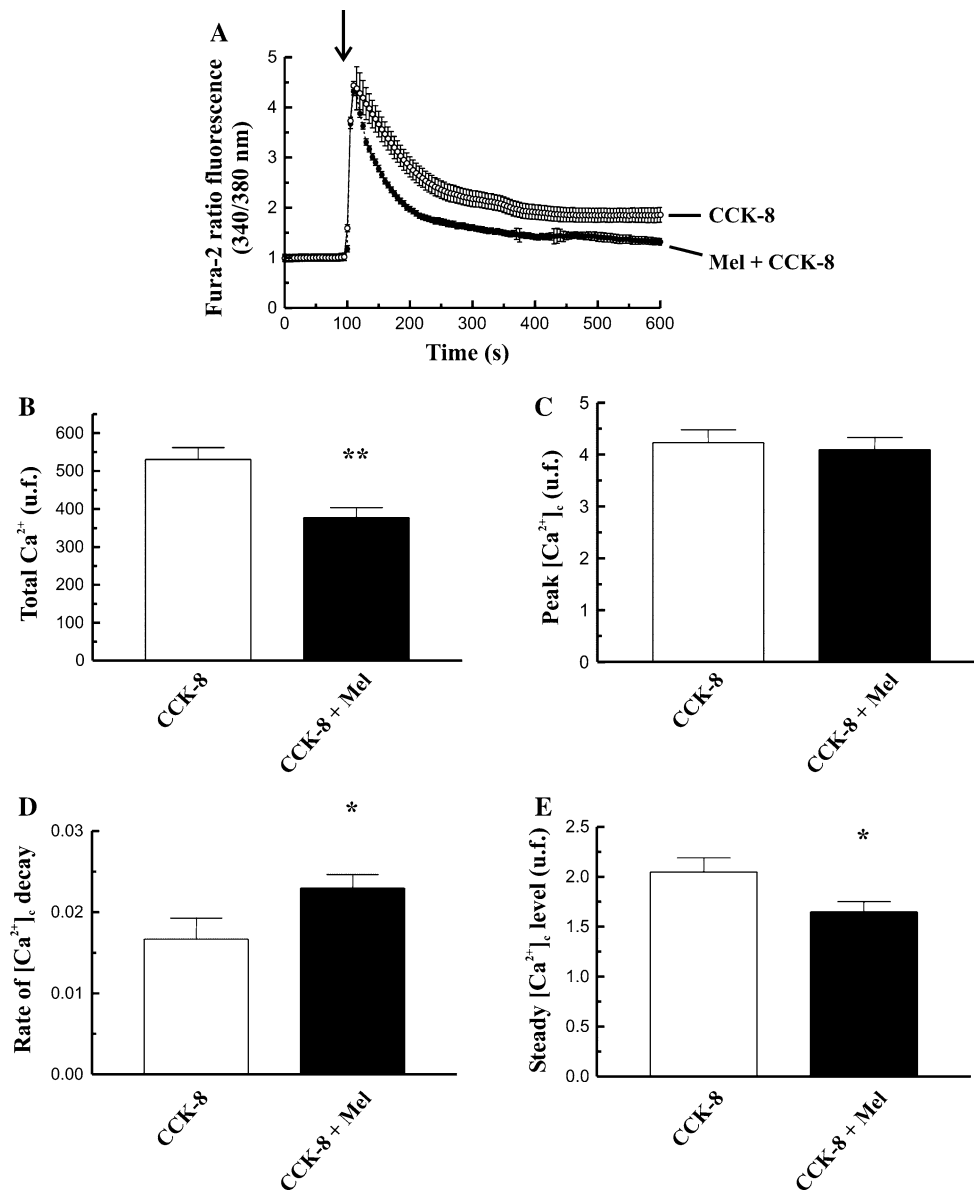


Fig. 1 Effect of melatonin on CCK-8-induced changes in $[Ca^{2+}]_c$ in mouse pancreatic acinar cells. **a** Time-courses of changes in fura-2-derived fluorescence in response to 1 nM CCK-8 alone (open circles) or in the presence of 100 μ M melatonin (5 min preincubation; full circles). The arrow indicates the time point at which CCK-8 was added to the cells. The experiments were carried out in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium. The traces show the response detected under each treatment, taken from 11 to 19 independent experiments. **b** Histogram depicting the total Ca^{2+} mobilization evoked by CCK-8 alone (open column) or in the presence of melatonin (full column). **c** The

columns show the peak of $[Ca^{2+}]_c$ induced by CCK-8 in the absence (open column) or in the presence (full column) of melatonin. **d** Histogram showing the decay of $[Ca^{2+}]_c$ after stimulation of cells with CCK-8 alone (open column) or in the presence of melatonin (full column). **e** The columns show the steady-state value reached after incubation of cells with CCK-8 without (open column) or in combination with melatonin (full column). In the histograms, data are expressed as units of fura-2 fluorescence (u. f.), related to changes in $[Ca^{2+}]_c$, and represent the mean \pm SEM of 11–19 independent experiments. (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs CCK-8 alone)

we performed the experiments in the absence of extracellular Ca^{2+} , the effect of melatonin on CCK-8-evoked responses was similar to that observed in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium (data not shown). Our results suggest that melatonin appears to reduce the intracellular Ca^{2+} accumulation evoked by a supramaximal concentration of CCK-8.

Changes in $[Ca^{2+}]_c$ in response to Tps and effect of melatonin: transport of Ca^{2+} through plasma membrane Ca^{2+} -ATPase

Tps is a potent selective SERCA inhibitor and is often used to inhibit this pump [30]. In addition to SERCA, which replenishes the endoplasmic reticulum (ER), the plasma

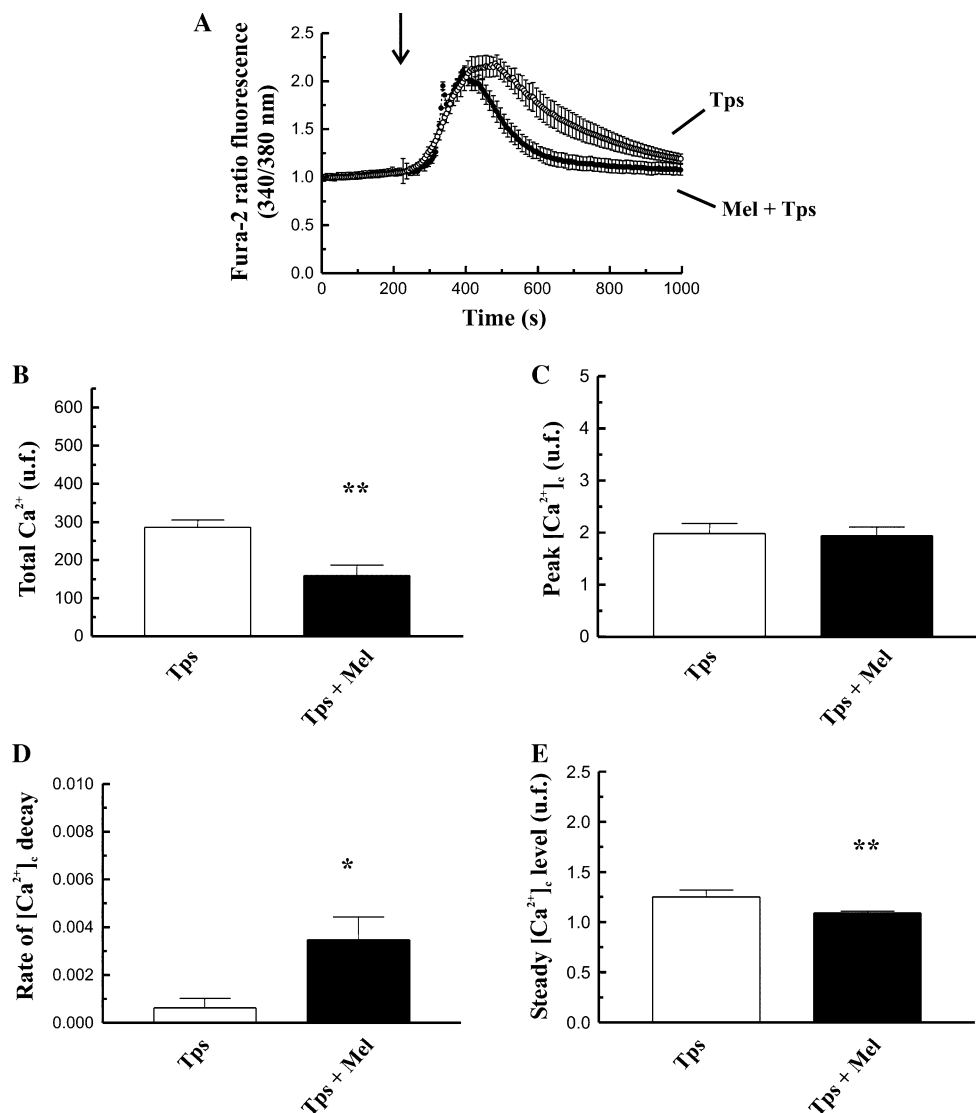


Fig. 2 Effect of melatonin on Tps-induced changes in $[Ca^{2+}]_c$ in mouse pancreatic acinar cells. **a** Time-courses of changes in fura-2-derived fluorescence in response to Tps. Cells were stimulated with 1 μ M Tps alone (*open circles*) or in the presence of 100 μ M melatonin (5 min preincubation; *full circles*). The arrow indicates the time point at which Tps was added to the cells. The experiments were carried out in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing 250 μ M EGTA). The traces show the response observed under each treatment, taken from 6 to 7 independent experiments. **b** Histogram depicting the total Ca^{2+} mobilization evoked by Tps alone (*open column*) or in the presence of melatonin (*full column*). **c** The columns

show the peak of $[Ca^{2+}]_c$ reached with Tps in the absence (*open column*) or in the presence (*full column*) of melatonin. **d** Histogram showing the decay of $[Ca^{2+}]_c$ after stimulation of cells with Tps alone (*open column*) or in the presence of melatonin (*full column*). **e** The columns show the steady-state value reached after incubation of cells with Tps without (*open column*) or in combination with melatonin (*full column*). In the histograms, data are expressed as units of fura-2 fluorescence (u. f.), related to changes in $[Ca^{2+}]_c$, and represent the mean \pm SEM of 6–7 independent experiments. (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs Tps alone)

membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) is another important mechanism involved in Ca^{2+} transport, which functions pumping the ion out of the cytosol toward the extracellular milieu [3]. Clearance of Ca^{2+} through PMCA is of critical relevance in pancreatic acinar cells [31]. Under inhibition of SERCA by Tps treatment, recovery of $[Ca^{2+}]_c$ will be mainly carried out by the PMCA.

Pancreatic acinar cells were incubated with 1 μ M Tps alone or in the presence of 100 μ M melatonin (Fig. 2a).

The experiments were performed in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing 250 μ M EGTA), to avoid contribution of extracellular Ca^{2+} to Tps-evoked Ca^{2+} signals. Incubation of cells with 1 μ M Tps led to an increase in $[Ca^{2+}]_c$ that was followed by a progressive decrease toward a value over the prestimulation level. For calculations, we employed the level of fluorescence achieved 10 min after stimulation as a reference point (“10-min value”). When the cells were stimulated with Tps

in the presence of 100 μM melatonin, the total Ca^{2+} mobilization was significantly decreased ($P < 0.01$; Fig. 2b). We did not observe differences in the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ reached, compared with that obtained with Tps alone (Fig. 2c). This indicates that melatonin does not affect the inhibitory action of Tps on SERCA. In addition, we observed an increased rate of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ toward the basal value ($P < 0.05$; Fig. 2d). Subsequently, a lower 10-min value was reached (measured 10 min after stimulation; $P < 0.01$; Fig. 2e), as compared with the response observed when Tps was applied to the cells in the absence of melatonin. The results suggest that melatonin appears to increase Ca^{2+} extrusion toward the extracellular space, possibly by PMCA, diminishing Tps-induced intracellular Ca^{2+} accumulation.

Analysis of Ca^{2+} uptake into the ER and effect of melatonin

Ca^{2+} transport from the cytosol into the ER through SERCA was analyzed. For this purpose, the PMCA was inhibited by incubation of cells in the presence of LaCl_3 (1 mM) [3, 32]. Now, after an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$, the rate of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ can be considered as an indicative of Ca^{2+} transport into intracellular stores, mainly the ER.

Pancreatic acinar cells were incubated for 2 min in the presence of 1 mM LaCl_3 , prior to stimulation with CCK-8, and in the presence or in the absence of melatonin (100 μM). In this group of experiments, we employed a medium nominally free of Ca^{2+} (i.e., no Ca^{2+} was added, and EGTA was omitted in order to avoid competition with La^{3+}).

Figure 3a shows the time-course of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ obtained after stimulation of cells with CCK-8 in the presence of LaCl_3 (open circles) or in the presence of LaCl_3 plus melatonin (full circles). When cells were challenged with CCK-8 in the presence of La^{3+} , and after preincubation of cells for 5 min in the presence of melatonin (100 μM), the total Ca^{2+} mobilization was significantly decreased, compared with the results obtained after stimulation of cells with CCK-8 plus La^{3+} in the absence melatonin (Fig. 3b; $P < 0.001$). We did not find statistically significant differences in the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ reached in the absence or in the presence of melatonin (Fig. 3c). In the presence of the indole, the rate of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was increased (Fig. 3d; $P < 0.05$), and the steady-state level reached was lower (Fig. 3e; $P < 0.05$), in comparison with the values observed in the absence of melatonin. These results suggest that melatonin may stimulate Ca^{2+} transport into cytosolic stores, probably the ER, leading to a reduced intracellular Ca^{2+} accumulation in response to CCK-8.

Ca^{2+} accumulation into mitochondria

After stimulation of pancreatic acinar cells with CCK-8, Ca^{2+} released from the ER can be taken up by mitochondria [33]. The increased clearance of Ca^{2+} from the cytosol that we have observed in the presence of melatonin could be a consequence of a stimulation of Ca^{2+} accumulation into mitochondria. Therefore, we performed a series of experiments in which Ca^{2+} uptake into mitochondria was impaired by incubation of cells in the presence of the mitochondrial uncoupler FCCP. The protonophore depolarizes mitochondria, and subsequent disruption of the negative membrane potential will impair Ca^{2+} uptake by the organelle [33].

In a first set of experiments, cells were preincubated for 2 min in the presence of 100 nM FCCP and then stimulated with CCK-8 (1 nM). The results obtained are summarized in Fig. 4a–d (open bars). Next, cells were preincubated with melatonin (100 μM ; full bars) in addition to FCCP (100 nM) and stimulated with CCK-8 (1 nM). In comparison with the values observed in the absence of melatonin (open bars), in the presence of melatonin (full bars), we noted that the total Ca^{2+} mobilization was slightly smaller although not statistically significant (Fig. 4a). There were no differences in the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ achieved (Fig. 4b). The rate of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ toward the basal value was increased (Fig. 4c, $P < 0.05$), and a lower steady-state level of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was reached (Fig. 4d, $P < 0.05$). These results suggest that melatonin may stimulate clearance of cytosolic Ca^{2+} through a mechanism different from Ca^{2+} uptake into mitochondria.

The effect of blockade of mitochondrial contribution to Ca^{2+} clearance from the cytosol was further studied. This time cells were preincubated with 100 nM FCCP in combination with Tps (1 μM), to additionally block SERCA (results are shown in Fig. 4; squared and vertical bars).

When pancreatic acinar cells were preincubated with melatonin (100 μM), stimulation with Tps (1 μM) plus FCCP (100 nM) induced a smaller total Ca^{2+} mobilization, in comparison with the values obtained when melatonin was not present in the extracellular solution (Fig. 4a, $P < 0.05$). There were no statistically significant differences in the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ achieved (Fig. 4b). The rate of decay of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ toward the basal value was increased (Fig. 4c, $P < 0.05$), and we observed a lower but not significant steady-state level of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Fig. 4d).

Additionally, we performed other experiments in which pancreatic acinar cells were stimulated with CCK-8 in the presence of a combination of 100 nM FCCP plus 1 mM LaCl_3 , to block both mitochondrial Ca^{2+} uptake and PMCA. The results can be seen in Fig. 4 (horizontal and dotted bars). When the same combination of stimuli was applied in the presence of 100 μM melatonin (5 min preincubation), we

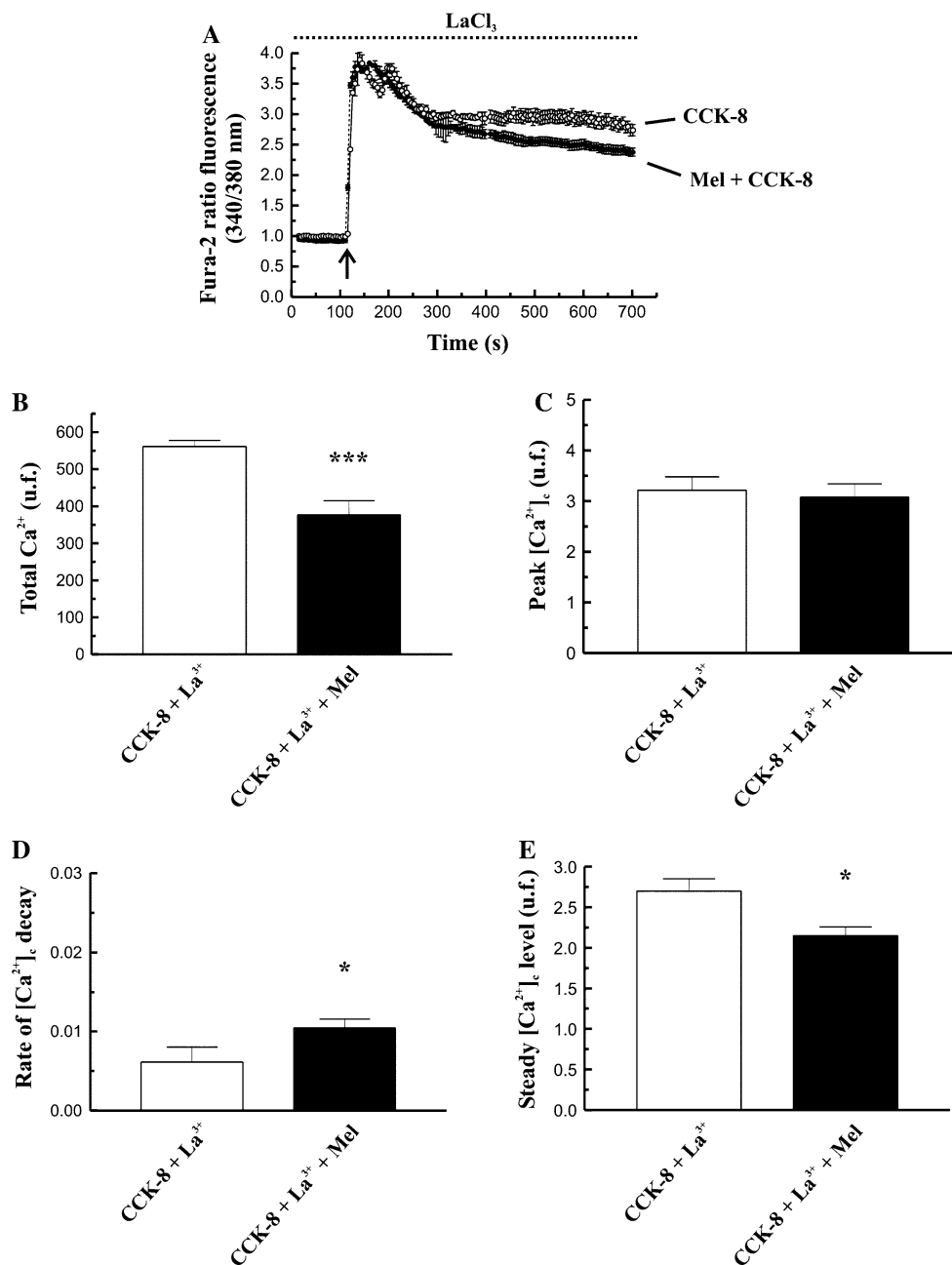


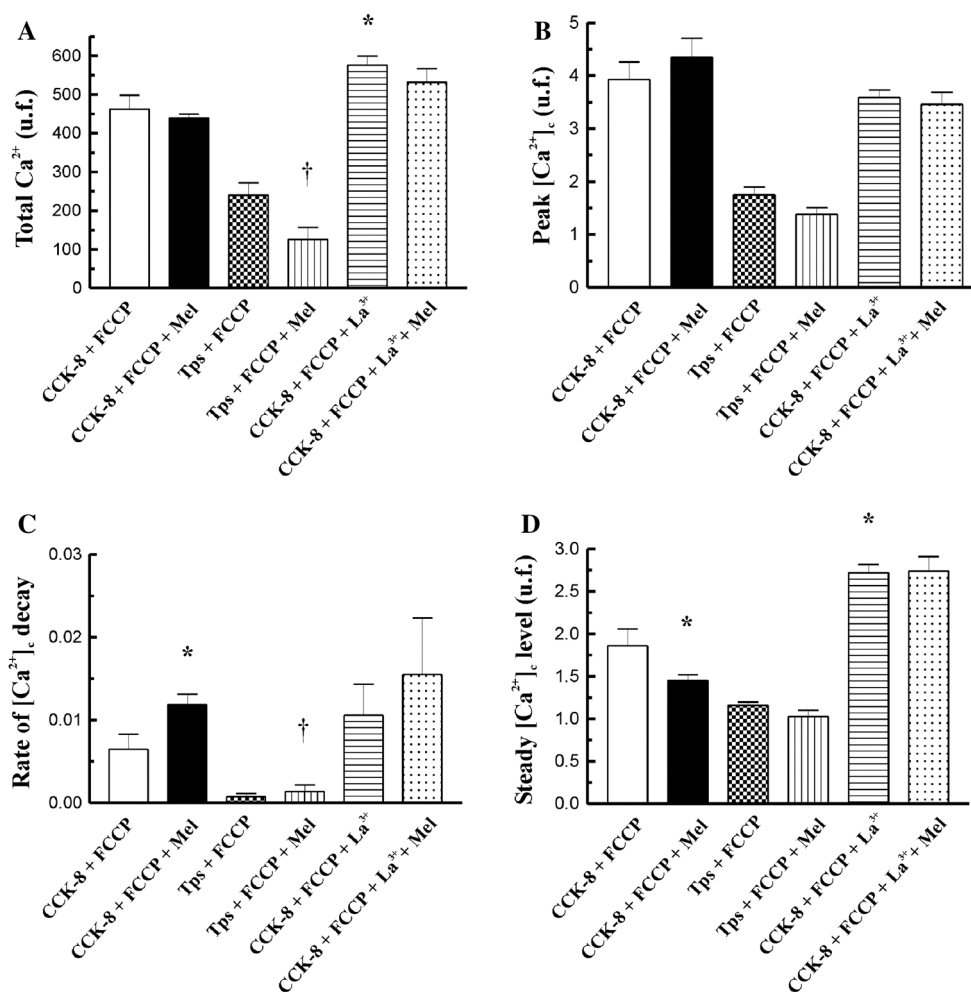
Fig. 3 Effect of melatonin on CCK-8-induced changes in $[Ca^{2+}]_c$ in mouse pancreatic acinar cells after inhibition of PMCA by La^{3+} . **a** Time-courses of changes in fura-2-derived fluorescence evoked by CCK-8 in mouse pancreatic acinar cells incubated in the presence of 1 mM $LaCl_3$ (open circles) or $LaCl_3$ plus 100 μ M melatonin (5 min preincubation; full circles). The arrow indicates the time point at which CCK-8 was added to the cells. The experiments were carried out in a medium nominally free of Ca^{2+} , i.e., no Ca^{2+} was added and EGTA was omitted in order to avoid competition with La^{3+} . The traces show the response observed under each treatment, taken from 11 to 12 independent experiments. **b** Histogram depicting the total Ca^{2+} mobilization evoked by CCK-8 alone (open column) or in the

presence of melatonin (full column). **c** The columns show the peak of $[Ca^{2+}]_c$ reached with CCK-8 in the absence (open column) or in the presence (full column) of melatonin. **d** Histogram showing the decay of $[Ca^{2+}]_c$ after stimulation of cells with CCK-8 alone (open column) or in the presence of melatonin (full column). **e** The columns show the steady-state value reached after incubation of cells with CCK-8 without (open column) or in combination with melatonin (full column). In the columns data are expressed as units of fura-2 fluorescence (u. f.), related to changes in $[Ca^{2+}]_c$, and represent the mean \pm SEM of 11–12 independent experiments (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs CCK-8 alone)

detected no statistically significant differences in the values of total Ca^{2+} mobilization (Fig. 4a), in the peak of $[Ca^{2+}]_c$ achieved (Fig. 4b), in the rate of decay of $[Ca^{2+}]_c$ toward the

basal value (Fig. 4c), nor in the steady-state level of $[Ca^{2+}]_c$ achieved (Fig. 4d), as compared with the values found in the absence of the indole.

Fig. 4 Histograms depicting the characteristics of the Ca^{2+} response induced by CCK-8, Tps or CCK-8 plus La^{3+} , alone or in the presence of melatonin, after uncoupling of mitochondria with FCCP. Mouse pancreatic acinar cells were incubated in the presence of 100 nM FCCP (to uncouple mitochondria). Some batches of cells were additionally incubated with 100 μM melatonin (5 min preincubation). Cells were then stimulated with 1 nM CCK-8 or 1 μM Tps. Ca^{2+} mobilization was calculated as described in “Materials and methods”. Data are expressed as units of fura-2 fluorescence (u. f.), related to changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$, and represent the mean \pm SEM of 4–9 independent experiments. (* $P < 0.05$ vs CCK-8 plus FCCP; † $P < 0.05$ vs Tps plus FCCP)



Finally, we performed a series of experiments in which we inhibited both SERCA and PMCA, by simultaneous incubation of cells in the presence of Tps (1 μM) plus LaCl_3 (1 mM). Under these experimental conditions, mitochondria is the putative organelle that will take up Ca^{2+} that is mobilized by Tps. Cells were challenged in the absence or in the presence of melatonin (100 μM) in the extracellular solution (Fig. 5). Figure 5a shows the time-course of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ obtained after incubation of cells with Tps in the presence of LaCl_3 (open circles) or in the presence of LaCl_3 plus melatonin (full circles). Now we did not find statistically significant differences in the parameters studied in the presence of melatonin (full bars) in comparison with the results obtained in the absence of melatonin in the perfusion medium (open bars) (Fig. 5b–e).

The results obtained when the cells were stimulated with CCK-8 or Tps alone or in combination with La^{3+} plus melatonin and FCCP were compared with those obtained in the absence of FCCP. No major differences between the results obtained in the presence or in the absence of FCCP in all groups of treatments were observed. Our results

suggest that Ca^{2+} uptake by mitochondria might not be stimulated by melatonin in mouse pancreatic acinar cells.

Discussion

Ca^{2+} is a second messenger that plays a major role in the control of exocrine pancreas physiology, but it has also been involved in the development of pancreatic illness. Under physiological conditions, following an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$, Ca^{2+} ions are transported out of the cell toward the extracellular medium. The ion can also be taken up by cytosolic organelles. These mechanisms are involved in the restoration of resting $[\text{Ca}^{2+}]_c$. However, uncontrolled Ca^{2+} signals and accumulation within the cytosol, which lead to a maintained high $[\text{Ca}^{2+}]_c$, may represent the basis for the onset of pancreatic disease [23]. In this line, hyperstimulation with cholecystokinin leads to an abnormal sustained rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$. This is followed by activation of digestive enzymes within the gland, which has been related to the onset of pancreatitis [34]. A supraphysiological

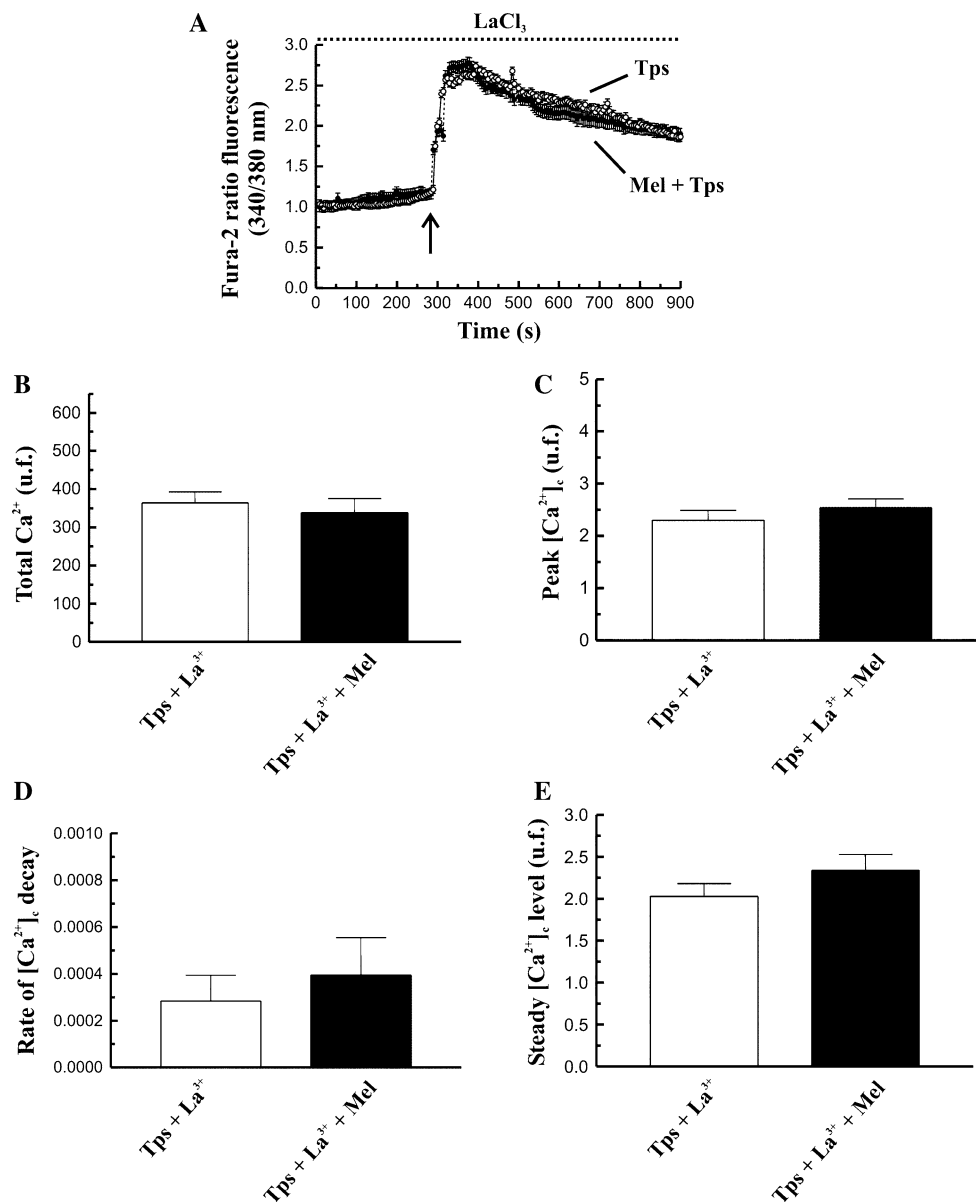


Fig. 5 Changes in $[Ca^{2+}]_c$ induced by Tps in mouse pancreatic acinar cells in the presence of $LaCl_3$. **a** Time-courses of changes in fura-2-derived fluorescence evoked by 1 μM Tps in the presence of 1 mM $LaCl_3$ and in the absence of 100 μM melatonin (*open circles*), or in the presence of $LaCl_3$ plus melatonin (5 min preincubation; *full circles*). The *arrow* indicates the time point at which Tps was added to the cells. The experiments were carried out in a medium nominally free of Ca^{2+} (i.e., no Ca^{2+} was added and EGTA was omitted in order to avoid competition with La^{3+}). The traces show the response observed under each treatment, taken from 5 to 7 independent experiments. **b** Histogram depicting the total Ca^{2+} mobilization evoked by Tps plus $LaCl_3$ (*open column*) or in the additional presence

of melatonin (*full column*). **c** The *columns* show the peak value of $[Ca^{2+}]_c$ reached with Tps plus $LaCl_3$ in the absence (*open column*) or in the presence (*full column*) of melatonin. **d** Histogram showing the decay of $[Ca^{2+}]_c$ after stimulation of cells with a combination of Tps plus $LaCl_3$ in the absence (*open column*) or in the presence of melatonin (*full column*). **e** The *columns* show the steady-state value reached after incubation of cells with Tps plus $LaCl_3$ without (*open column*) or in combination with melatonin (*full column*). In the histograms, data are expressed as units of fura-2 fluorescence (u. f.), related to changes in $[Ca^{2+}]_c$, and represent the mean \pm SEM of 5–7 independent experiments

concentration of CCK is not normally reached. However, it could be found under pathological conditions that could lead to overstimulation of the gland and a concomitant pancreatitis. Concentrations of CCK in the nanomolar and millimolar range are usually employed to simulate a

physiopathological stimulation of the gland to induce pancreatitis [9, 10, 35, 36]. Therefore, any physiological procedures directed to reduce accumulation of Ca^{2+} in the cytosol might counteract a situation potentially leading to a pancreatic disorder. Despite the numerous studies carried

out to understand the actions of melatonin on the exocrine pancreas physiology, the effects of melatonin on intracellular Ca^{2+} homeostasis need to be further studied, bearing in mind that most pancreatic activity is initiated by changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

In the present study, the effects of melatonin on Ca^{2+} homeostasis in mouse pancreatic acinar cells stimulated with a potentially damaging concentration of CCK-8 have been investigated. Attention has been paid to the major mechanisms involved in the restoration of resting $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Our results show that, in the presence of melatonin, there is a lessening of the total Ca^{2+} mobilization evoked by CCK-8. This fact appears to reduce the intracellular Ca^{2+} overload evoked by CCK-8. In pancreatic cells, a lower $[\text{Ca}^{2+}]_c$ can be the result of a smaller release of Ca^{2+} from the intracellular stores, a diminished influx from the extracellular space, and/or the consequence of an efficient transport of Ca^{2+} ions out of the cytosol.

The examination of our results revealed that the initial Ca^{2+} release from intracellular stores evoked by CCK-8 might not be reduced in the presence of melatonin. This was indicated by the analysis of the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ reached after stimulation of cells with CCK-8 in the absence or in the presence of melatonin, which was not statistically different between both groups. In a recent work, a release of Ca^{2+} did not detect from the intracellular stores by incubation of pancreatic acinar cells in the presence of melatonin. In addition, Ca^{2+} influx from the extracellular space was not changed in the presence of melatonin [25]. Therefore, the smaller total Ca^{2+} mobilization observed in the presence of melatonin cannot be explained by a smaller amount of Ca^{2+} released by a secondary application of CCK-8 after preincubation with melatonin. Accordingly, an increased transport of Ca^{2+} out of the cytosol might explain the lower level of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ achieved after stimulation of pancreatic acinar cells with CCK-8 in the presence of melatonin. The mechanisms probably stimulated in the presence of the indole might include transport of Ca^{2+} through the plasma membrane toward the extracellular medium, transport of Ca^{2+} into the ER and/or uptake of Ca^{2+} by mitochondria.

From the set of experiments carried out in the presence of Tps, which were directed to study transport of Ca^{2+} through PMCA, our results suggest that melatonin appears to increase Ca^{2+} extrusion through the plasma membrane. This would lead to a reduced intracellular Ca^{2+} accumulation after stimulation of cells with CCK-8. On the other hand, when PMCA was inhibited by incubation of pancreatic acinar cells in the presence of La^{3+} , we also observed that Ca^{2+} transport into cytosolic stores (ER and/or mitochondria) might be stimulated in the presence of melatonin. This could also lead to a reduced level of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ after stimulation of cells with CCK-8. In this

regard, it has been shown that the rapid uptake of Ca^{2+} by SERCA pump limits the peak amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in rat pancreatic beta-cells [37]. We have also shown that, in addition to PMCA, SERCA plays an important role in controlling $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in mouse pancreatic acinar cells [38]. These observations are in agreement with a recent report by Huai et al. [24], who have shown that melatonin induces up-regulation of SERCA and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression. The authors suggested that melatonin might increase Ca^{2+} transport through these mechanisms, although this fact was not studied.

It is also possible that melatonin increased Ca^{2+} uptake into mitochondria, in order to reduce $[\text{Ca}^{2+}]_c$. However, despite the existence of this transport, our results suggest that uptake of Ca^{2+} by these organelles might not play a crucial role in pancreatic acinar cells. We conclude this because the data of Ca^{2+} mobilization observed in the FCCP-treated groups were not statistically different in comparison with those obtained in the absence of FCCP. This observation is reinforced by the results obtained after simultaneous incubation of cells in the presence of Tps (to inhibit SERCA) plus LaCl_3 (to inhibit PMCA), with or without melatonin in the perfusion medium, which were not statistically different from each other (Fig. 5).

Uncoupling of mitochondria by FCCP could lead to a lower ATP availability that, in turn, could affect Ca^{2+} transport through the cellular Ca^{2+} -ATPases (SERCA and PMCA). This could decrease their Ca^{2+} transport ability. A stimulation of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger by melatonin could then compensate for Ca^{2+} transport out of the cytosol. In this scenario, the stimulation of the ion exchanger might be the mechanism responsible for the reduction of the total Ca^{2+} mobilization evoked by CCK-8 or Tps. This would support also the findings reported by Huai et al. [24] that we have mentioned above. Nevertheless, it has been previously suggested that Ca^{2+} extrusion in pancreatic acinar cells is not mediated by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange but rather by the PMCA [39]. Additionally, it has been suggested that inhibition of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger has minor effects on Ca^{2+} dynamics in rat pancreatic beta-cells [37]. Therefore, as analyzed above, melatonin could fairly stimulate Ca^{2+} transport through the PMCA out of the cell, or into ER by SERCA.

Our observations are supported by previous works that demonstrated the ability of PMCA and SERCA to remove the large amount of Ca^{2+} released from the intracellular pools in pancreatic acinar cells [38, 39] and in rat pancreatic beta-cells [37]. However, in view of our results, we think that SERCA might not play a pivotal role in melatonin-induced Ca^{2+} transport in our cellular model. We gain this conclusion from the results obtained in the experiments carried out in the presence of FCCP (to uncouple mitochondria) plus LaCl_3 (to inhibit PMCA).

Under these experimental conditions, SERCA is not inhibited (Tps was not present in the extracellular medium), and we did not observe statistically significant differences between the Ca^{2+} parameters studied, in the presence or in the absence of melatonin (Fig. 4, horizontal and dotted bars).

The study of the actions of melatonin on pancreatic cell physiology can be performed *in vivo* or *in vitro*. Studies on isolated pancreatic cells can be a useful model to investigate the direct effects of certain drugs, whereas *in vivo* there are numerous indirect mechanisms involved in the regulation of pancreatic enzyme secretion (which add complexity to the studies). Therefore, the effects of melatonin *in vitro* cannot be directly compared to the *in vivo* studies.

Melatonin also might behave differently when acting at physiological or pharmacological concentrations. At a first glance, the concentration of melatonin that we have employed could be considered rather more pharmacological than physiological, because it is higher than that found normally in blood. Nevertheless, it is a concentration that has been widely employed in current and past *in vitro* studies. Additionally, it is worth noting that many tissues synthesize melatonin for their local use as an autocrine or paracrine agent. In some animal species, the levels of melatonin in the gastrointestinal tract exceed the blood levels by 10–100 times. The gut contains at least 400 times more melatonin than the pineal gland [11]. Also, some fluids (e.g., bile, cerebrospinal fluid, etc.) have concentrations of melatonin, which are orders of magnitude higher than those in the blood [40]. Therefore, in general, blood levels of melatonin cannot be used to define physiological concentrations, because the local concentrations of melatonin remain undefined.

In conclusion, our findings support a protective action of melatonin in the exocrine pancreas. We want to highlight that melatonin is not inhibiting Ca^{2+} mobilization by CCK-8 in pancreatic acinar cells. The indoleamine rather modulates Ca^{2+} handling by the cell, which is based on a more efficient transport of Ca^{2+} across cell membranes. Because cell dysfunction may result from excessive accumulation of Ca^{2+} within the intracellular milieu, melatonin might alleviate a cytosolic Ca^{2+} overload following stimulation of cells with Ca^{2+} -mobilizing agonists. We cannot completely exclude that melatonin might stimulate the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger at the cell membrane, or the SERCA at the ER. Nevertheless, our results rather suggest that transport of Ca^{2+} by PMCA is the major mechanism stimulated by melatonin to regulate the levels of cytosolic Ca^{2+} achieved in response to agonists in mouse pancreatic acinar cells.

Acknowledgements The authors declare that there is no conflict of interest. This work was supported by Junta de Extremadura-FEDER

(GR10010). Patricia Santofimia-Castaño was granted a fellowship from Junta de Extremadura (Consejería de Economía, Comercio e Innovación) and European Social Fund. The authors would like to thank Mrs. Mercedes Gomez Blázquez for her excellent technical support.

References

1. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67–69
2. Putney JW (1988) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1–12
3. Carafoli E (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 71:129–153
4. Petersen OH, Tepikin AV (2008) Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annu Rev Physiol* 70:273–299
5. Petersen OH, Sutton R (2006) Ca^{2+} signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci* 27:113–120
6. González A, Pariente JA, Salido GM (2008) Ethanol impairs calcium homeostasis following CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol* 42:565–573
7. Thomas RP, Hellmich MR, Townsend CM Jr, Evers BM (2003) Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. *Endocr Rev* 24:571–599
8. Williams JA (2010) Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol* 26:478–483
9. Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V (2007) Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu Rev Physiol* 69:249–269
10. Osborne AL, Smith AT, Engle SK, Watson DE, Sullivan JM, Walgren JL (2014) Biomarkers of exocrine pancreatic injury in 2 rat acute pancreatitis models. *Toxicol Pathol* 42:195–203
11. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M (2011) Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol* 17:3888–3898
12. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Coto-Montes A, Boga JA, Tan DX, Davis JM, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T (2011) The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: the requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. *J Physiol Pharmacol* 62:269–274
13. González A, del Castillo-Vaquero A, Miró-Morán A, Tapia JA, Salido GM (2011) Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J Pineal Res* 50:250–260
14. Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E (2009) Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606:61–71
15. Gülben K, Ozdemir H, Berberoğlu U, Mersin H, Yrkin F, Cakır E, Aksaray S (2010) Melatonin modulates the severity of taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 55:941–946
16. Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T, Konturek SJ (2003) Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 34:40–52
17. Jaworek J, Zwirska-Korczala K, Szklarczyk J, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Jaworek AK, Tomaszewska R (2010) Pineal-ectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacol Rep* 62:864–873
18. Qi W, Tan DX, Reiter RJ, Kim SJ, Manchester LC, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC (1999) Melatonin reduces lipid peroxidation

- and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 44:2257–2262
19. Çöl C, Dımler K, Hasdemir O, Büyükaşık O, Firat T, Kükner A (2010) Evaluation of the effects of melatonin administration intraperitoneally on rats with acute pancreatitis induced by ductal ligation. *Turk J Gastroenterol* 21:433–438
 20. Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túnez I, Montilla P, Pera C, Muntané J (2006) Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 40:195–203
 21. Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ (2010) Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 49:248–255
 22. Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E (2012) Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1). *J Pineal Res* 53:344–357
 23. Petersen OH (2004) Local and global Ca^{2+} signals: physiology and pathophysiology. *Biol Res* 37:661–664
 24. Huai J, Shao Y, Sun X, Jin Y, Wu J, Huang Z (2012) Melatonin ameliorates acute necrotizing pancreatitis by the regulation of cytosolic Ca^{2+} homeostasis. *Pancreatol* 12:257–263
 25. Santofimia-Castaño P, Ruy DC, Salido GM, González A (2013) Melatonin modulates Ca^{2+} mobilization and amylase release in response to cholecystokinin octapeptide in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol Biochem* 69:897–908
 26. González A, Camello PJ, Pariente JA, Salido GM (1997) Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun* 230:652–656
 27. González A, Schmid A, Sternfeld L, Krause E, Salido GM, Schulz I (1999) Cholecystokinin-evoked Ca^{2+} waves in isolated mouse pancreatic acinar cells are modulated by activation of cytosolic phospholipase A2, phospholipase D, and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 261:726–733
 28. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
 29. Del Castillo-Vaquero A, Salido GM, González A (2010) Melatonin induces calcium release from CCK-8- and thapsigargin-sensitive cytosolic stores in pancreatic AR42J cells. *J Pineal Res* 49:256–263
 30. Nielsen SF, Thastrup O, Pedersen R, Olsen CE, Christensen SB (1995) Structure–activity relationships of analogues of thapsigargin modified at O-11 and O-12. *J Med Chem* 38:272–276
 31. Camello P, Gardner J, Petersen OH, Tepikin AV (1996) Calcium dependence of calcium extrusion and calcium uptake in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 490:585–593
 32. Bautista DM, Hoth M, Lewis RS (2002) Enhancement of calcium signaling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *J Physiol* 541:877–894
 33. González A, Granados MP, Salido GM, Pariente JA (2003) Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* 15:1039–1048
 34. Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH (2000) Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13126–13131
 35. Fakhari S, Abdolmohammadi K, Panahi Y, Nikkhoo B, Peirmohammadi H, Rahmani MR, Moghadam AS, Jalili A (2013) Glycyrrhizin attenuates tissue injury and reduces neutrophil accumulation in experimental acute pancreatitis. *Int J Clin Exp Pathol* 7:101–109
 36. Weber H, Hühns S, Lüthen F, Jonas L (2009) Calpain-mediated breakdown of cytoskeletal proteins contributes to cholecystokinin-induced damage of rat pancreatic acini. *Int J Exp Pathol* 90:387–399
 37. Hughes E, Lee AK, Tse A (2006) Dominant role of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump in Ca^{2+} homeostasis and exocytosis in rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 147:1396–1407
 38. Rivera-Barreno R, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, Gonzalez A (2010) Effect of cinnamtannin B-1 on cholecystokinin-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:980–988
 39. Tepikin AV, Voronina SG, Gallacher DV, Petersen OH (1992) Acetylcholine-evoked increase in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration and Ca^{2+} extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 267:3569–3572
 40. García-Marín R, de Miguel M, Fernández-Santos JM, Carrillo-Vico A, Utrilla JC, Morillo-Bernal J, Díaz-Parrado E, Rodríguez-Prieto I, Guerrero JM, Martín-Lacave I (2012) Melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptor in rat thyroid cells. *Histol Histopathol* 27:1429–1438

Ebselen Alters Mitochondrial Physiology and Reduces Viability of Rat Hippocampal Astrocytes

Patricia Santofimia-Castaño, Ginés M. Salido, and Antonio González

The seleno-organic compound and radical scavenger ebselen (2-phenyl-1,2-benziselenazol-3(2H)-one) have been extensively employed as an anti-inflammatory and neuroprotective compound. However, its glutathione peroxidase activity at the expense of cellular thiols groups could underlie certain deleterious actions of the compound on cell physiology. In this study, we have analyzed the effect of ebselen on rat hippocampal astrocytes in culture. Cellular viability, the intracellular free- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), the mitochondrial free- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_m$), and mitochondrial membrane potential (ψ_m) were analyzed. The caspase-3 activity was also assayed. Our results show that cell viability was reduced by treatment of cells with ebselen, depending on the concentration employed. In the presence of ebselen, we observed an initial transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ that was then followed by a progressive increase to an elevated plateau. We also observed a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_m$ in the presence of ebselen that returned toward a value over the prestimulation level. The compound induced depolarization of ψ_m and altered the permeability of the mitochondrial membrane. Additionally, a disruption of the mitochondrial network was observed. Finally, we did not detect changes in caspase-3 activation in response to ebselen treatment. Collectively, these data support the likelihood of ebselen, depending on the concentration employed, reduces viability of rat hippocampal astrocytes via its action on the mitochondrial activity. These may be early effects that do not involve caspase-3 activation. We conclude that, depending on the concentration used, ebselen might exert deleterious actions on astrocyte physiology that could compromise cell function.

Introduction

ASTROCYTES REPRESENT THE major brain cell population in the mammalian central nervous system (CNS) and are intimately associated with neurons. This cell type was initially considered to form a substrate with supportive and metabolic roles in the CNS. However, nowadays, it is known that astrocytes provide more than a mere structural and trophic support for the neurons. Astrocytes respond with an increase in the intracellular free- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) after stimulation with a variety of neurotransmitters, neuromodulators, and hormones. They play an important role in the developmental guidance of migrating neurons, in the regulation of neurotransmitter and ion levels, in the nutrition of neurons, and in the production of neurotrophic factors (Eysseric *et al.*, 2000). Furthermore, astrocytes communicate with other surrounding astrocytes and neurons, and thereby regulate the neuronal activity and synaptic neurotransmission (Araque *et al.*, 2001). Thus, impairment of astrocyte physiology may compromise brain function.

The seleno-organic compound 2-phenyl-1,2-benziselenazol-3(2H)-one (ebselen) is a substance with the radical-scavenging activity (Fujisawa and Kadoma, 2005). The ebselen

main effect involves attenuation of a free radical generation and detoxification of free radicals and the toxic products of their reactions. Its beneficial effects are mediated through its antioxidant and glutathione peroxidase-mimetic properties. Therefore, it has been extensively employed as an anti-inflammatory and neuroprotective compound.

Ebselen acts as an antiaging agent by attenuating oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* (Avila *et al.*, 2012), protects neurons from ischemic damage via control of the expressions of GABA shunt enzymes (Seo *et al.*, 2009), has a marked inhibitory effect on neuronal damage during stroke (Yamagata *et al.*, 2008), protects against excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina (Centurião *et al.*, 2005), and prevents ischemia-induced cytotoxicity and apoptosis (Gabryel and Malecki, 2006) and reactive oxygen species (ROS) production (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004) in astrocytes.

Epidemiological evidence suggests that overexposure to selenium can facilitate the appearance of chronic degenerative diseases. Under the ebselen's activity, as an enzyme mimic, the reaction catalyzed is that of a glutathione peroxidase. Substrates for the reaction vary from hydrogen peroxide and smaller organic hydroperoxides to membrane-bound phospholipids and cholesterol hydroperoxides, in

addition to other suitable thiol compounds (Sies, 1993). Many cellular proteins contain cysteine residues, are central to cellular homeostasis, and are sensitive to redox status (Murphy, 2012a). Thus, agents that block protein surface thiols can disrupt the activity of enzymes and transporters, by means of changing their redox status (Antony and Bayse, 2011). Indeed, it has been found that concentrations of 20, 50, and 100 μM ebselen induce cell death (Yang *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2009), for which the mechanism remains unclear.

We have previously shown that ebselen induced Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER). In addition, other signs were observed; those signs could be the basis of astroglial reactivity, which might evolve into impairment of astroglial physiology (Salazar *et al.*, 2008). In spite of the great number of investigations carried out to demonstrate the actions of ebselen against established pathological events, the hypothesis that ebselen might exert side effects on normal cell physiology requires further attention.

Here we show that ebselen, beyond its putative protective role against harmful radicals, depicts a dark side on astroglial physiology. Ebselen could significantly compromise astroglial function, in such a way that it might lead to detrimental consequences in healthy cells.

Materials and Methods

Subjects

Newborn (24 h) Wistar rats were used for this study. Animals were obtained from the animal house of the University of Extremadura. Animal procedures were approved by the institutional Bioethics Committee.

Materials

Cell culture reagents, the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Hank's balanced salts (HBSS), and Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA) were obtained from Gibco BRL (Invitrogen, Barcelona, Spain). MITO+ (concentrated serum extender) and rat-tail collagen were obtained from BD Biosciences (Bedford, MA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from HyClone (Thermo Scientific, Erembodegen, Belgium). Penicillin/streptomycin was obtained from BioWhittaker (Lonza, Basel, Switzerland). Papain was obtained from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ). AlamarBlue[®] was purchased from AbD serotec (bioNova Científica, Madrid, Spain). Ebselen, 1,2-Bis(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester (Dimethyl BAPTA), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (ACDEVD-AMC), and thapsigargin were obtained from Sigma Chemicals Co. (Madrid, Spain). Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM), MitoTracker[™] Green FM, rhod-2 acetoxymethyl ester (rhod-2/AM), tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM), and trypsin-EDTA were purchased from Invitrogen (Barcelona, Spain). All other reagents were of analytical grade.

Preparation of cell cultures

Subcultures of astrocytes were prepared following previously established methods (González *et al.*, 2006). Briefly, following extraction of the brain, the hippocampus was

dissected and subjected to digestion with papain during 1 h at 37°C. After enzymatic digestion the tissue was washed, resuspended in a culture medium consisting of DMEM supplemented with FBS (10%), penicillin (20,000 IU), streptomycin (0.1 mg/mL), and MITO+ (0.1%), and mechanically disaggregated by gently pipetting the tissue through tips of small diameter. Cells were then plated in 75-cm² flasks and allowed to grow in a culture medium at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂); cultures were confluent 10–14 days after seeding.

Thereafter, the culture medium was removed and replaced by the HBSS medium containing trypsin-EDTA. Cells were detached by 5-min incubation in this medium. The trypsinization step was stopped by adding a medium consisting of the culture medium supplemented with 0.25% bovine serum albumin and 0.25% trypsin inhibitor. Cells were centrifuged (50–60 g, 5 min) and resuspended in the culture medium. Finally, the cells were reseeded again in 75-cm² flasks and grown in the culture medium in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Cells reached confluence 10–12 days after reseeding. On the day of use, cells were detached by trypsinization, centrifuged (50–60 g, 5 min), and resuspended in a Na-*N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer containing (in mM) 140 NaCl, 4.7 KCl, 1.3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, and 0.2% bovine serum albumin (pH adjusted to 7.4). The purity of astrocytes culture obtained with this technique has been previously assessed by GFAP immunostaining in our laboratory. In our conditions, we can assume that over 95% of the cells were astrocytes (González *et al.*, 2006).

Cell viability assay

Analysis of cell proliferation and cytotoxicity under the different treatments applied was analyzed using AlamarBlue. This is a proven cell viability indicator that uses the natural reducing power of living cells. The active ingredient of AlamarBlue (resazurin) is a nontoxic, cell permeable compound that is blue in color and virtually nonfluorescent. Upon entering cells, resazurin is reduced to resorufin, which produces very bright red fluorescence. Viable cells continuously convert resazurin to resorufin, thereby generating a quantitative measure of viability and cytotoxicity.

To evaluate cell survival, once isolated, cells were centrifuged and transferred to a culture medium of the following composition: DMEM supplemented with FBS (10%), penicillin (20,000 IU), streptomycin (0.1 mg/mL), and MITO+ (0.1%). This medium was prepared under sterile conditions. Then, the cells were seeded onto independent Petri dishes (35-mm diameter) at a cell density of 30,000 per dish and incubated in the culture medium in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Twenty-four hours after isolation, cells were washed twice with standard phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH adjusted to 7.4) to remove death cells, and a fresh culture medium was added to the dishes. At this point, AlamarBlue was added to the dishes at the desired concentration and the cells were challenged with the stimuli. Determinations of cell viability were performed according to the manufacturer's directions.

Data of cell viability show the mean reduction of AlamarBlue expressed in percentage \pm S.E.M. (*n*) with respect to

EBSELEN AND RAT HIPPOCAMPAL ASTROCYTES

control (nonstimulated) cells, where n is the number of independent experiments.

Determination of intracellular free-Ca²⁺ concentration

Changes in $[Ca^{2+}]_c$ were monitored following changes in fura-2-derived fluorescence. For dye loading of the cells, the culture medium was replaced by a physiological solution containing 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, and 0.2% bovine serum albumin (pH=7.4 adjusted with NaOH). Cultured cells were then loaded with the fluorescent ratio-metric Ca²⁺ indicator fura-2 by incubation with fura-2/AM (4 μM) at room temperature (23°C–25°C) for 40 min as previously described (González *et al.*, 2002). Changes in fura-2-derived fluorescence closely report changes in $[Ca^{2+}]_c$ (Gryniewicz *et al.*, 1985).

For monitorization of Ca²⁺-dependent fluorescence signals, the coverslip with cultured astrocytes was mounted on an experimental perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Diaphot T200, Melville, NY). The cells were continuously superfused with a control Na-HEPES buffer containing (in mM) 140 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose (pH adjusted to 7.4).

For fura-2 fluorescence changes determination, an image acquisition and analysis system for video microscopy was employed (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Cells were alternatively excited with light from a xenon arc lamp passed through a high-speed monochromator (Polychrome IV, Photonics, Hamamatsu, Japan) at 340/380 nm. Fluorescence emission at 505 nm was detected using a cooled digital CCD camera (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu, Japan) and recorded using dedicated software (Aquacosmos 2.5, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). All fluorescence measurements were made from areas considered individual cells.

All stimuli were dissolved in the extracellular Na-HEPES buffer, and applied directly to the cells in the perfusion chamber. When Ca²⁺ free conditions were applied, the Na-HEPES buffer contained no added Ca²⁺ and was supplemented with 0.5 mM EGTA. In a set of experiments, cells were loaded with dimethyl 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra acetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM) (10 μM for 30 min), and then challenged with stimuli in the absence of extracellular Ca²⁺ (medium supplemented with 0.5 mM EGTA).

Experiments were performed at room temperature (23°C–25°C) and results are expressed as the mean ratio of fluorescence emitted at both excitation wavelengths previously normalized to the basal (resting) fluorescence ± SEM, n (where n is the number of independent experiments/number of analyzed cells of each treatment).

Determination of mitochondrial free-Ca²⁺ concentration

Determining changes in mitochondrial Ca²⁺ signals ($[Ca^{2+}]_m$) was performed following previously established methods (González *et al.*, 2000). Briefly, cells were loaded with rhod-2/AM (8 μM) at 4°C for 15 min. After incubation with rhod-2/AM, the extracellular medium was replaced by a fresh Na-HEPES buffer, and cells were incubated at room temperature (23°C–25°C) for 30 min. At the concentration used, rhod-2 accumulates within mitochondria. An increase

in rhod-2 fluorescence reflects an increase in $[Ca^{2+}]_m$. For monitoring fluorescence signals, coverslips with dye-loaded cells were placed in a perfusion chamber on the stage of the above-mentioned confocal system. Using a ×60 oil immersion objective fluorescence, images of 256 × 256 pixels with a resolution of 0.287 μm/pixel were recorded every 4 s. Excitation light at 543 nm from a 25-mW helium–neon laser was employed. Emitted fluorescence was collected through a 605/32-nm band-pass filter, employing different photomultipliers as previously described (González *et al.*, 2003). Neutral density filters had to be employed to reduce laser intensity to 1%–3% and diminish photobleaching. Results are expressed as the absolute values of fluorescence emission at the excitation wavelength employed. Data were normalized previously to the basal (resting) fluorescence values.

Mitochondrial membrane potential determination

Changes in ψ_m were recorded using the dye TMRM as described previously (González *et al.*, 2003). Cells were incubated during 30 min in the presence of 50 nM TMRM at 37°C. At the concentration used in our conditions, TMRM accumulates within mitochondria driven by the membrane potential, but autoquenching is negligible. A decrease in TMRM fluorescence reflects depolarization of ψ_m , because of diffusion of the dye to the cytosol. No TMRM was added to the medium after the initial loading period.

Fluorescence images from cells loaded with TMRM were obtained using the laser scanning confocal microscope mentioned earlier. Using a ×60 oil-immersion objective, fluorescence images of 256 × 256 pixels with a resolution of 0.287 μm/pixel were recorded every 4 s. TMRM was excited by the 543-nm line from a 25-mW helium–neon laser, and emission was collected through a 605/32-nm band-pass filter. Neutral density filters had to be employed to reduce laser intensity to 1%–3% and diminish photobleaching. Results are expressed as the absolute values of fluorescence emission at the excitation wavelength employed. Data were normalized previously to the basal (resting) fluorescence values.

Localization of mitochondria

Localization of mitochondria was assayed by incubation of astrocytes in the presence of MitoTracker Green FM. Loading of cells with MitoTracker Green FM (100 nM) was performed at room temperature (23°C–25°C) for 30 min. After incubation, the extracellular medium was replaced by the fresh Na-HEPES buffer. This dye has been employed as a mitochondrial marker (González *et al.*, 2003).

For monitoring fluorescence signals, coverslips with dye-loaded cells were placed in a perfusion chamber on the stage of a confocal Nikon Eclipse TE300 microscope (Nikon Instruments, Inc.) and continuously superfused with the Na-HEPES buffer. Fluorescence images from cells loaded with Mito Tracker Green FM were obtained employing a confocal laser scanning system Bio-Rad MRC 1024 (American Laser Corp., Salt Lake City, UT). Using a ×60 oil immersion objective fluorescence, images of 256 × 256 pixels with a resolution of 0.287 μm/pixel were recorded every 4 s.

Excitation light at 488 nm from a 100-mW argon laser was employed. Emitted fluorescence was collected through a 522/35-nm band-pass filter employing a photomultiplier, as previously described (González *et al.*, 2000). Laser intensity

was reduced to 1%–3% with neutral density filters to reduce photobleaching. The software used for the imaging was Laser Sharp MRC-1024 Version 3.2 (Bio-Rad, Deisenhofen, Germany).

Caspase activity assay

To determine the caspase-3 activity, stimulated or resting cells were sonicated and cell lysates were incubated with 2 mL of a substrate solution containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 5 mM dithiothreitol, and 8.25 μ M of caspase-3 substrate, for 2 h at 37°C.

Substrate cleavage was measured at an excitation wavelength of 360 nm and emission at 460 nm. An ELISA spectrofluorimeter (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria) was employed for the determinations. The activity of caspase was calculated from the cleavage of the specific fluorogenic substrate (AC-DEVDAMC). The data were calculated as fluorescence units per milligram of protein, and were presented as percentage \pm S.E.M. (n) with respect to control (nonstimulated) cells, where n is the number of independent experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed by one-way analysis of variance followed by the Tukey *post hoc* test, and only p -values < 0.05 were considered statistically significant. For individual comparisons and statistics between individual treatments, we employed the Student's *t*-test and only p -values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of ebselen on cell viability

In a former work, we proposed that astroglial physiology could be altered by ebselen (Salazar *et al.*, 2008). To investigate whether the antioxidant has any effect on cell viability, different batches of astrocytes were incubated for 24–96 h in the presence of no stimulus (control cells), ebselen (1, 10, and 100 μ M), or 100 μ M H_2O_2 . Viability of astrocytes did not change significantly along the incubation period in the presence of 1 μ M ebselen compared to control (unstimulated) cells, considered 100% (Fig. 1A). However, cell survival was reduced following incubation of cells in the presence of 10 and 100 μ M ebselen, compared to control cells. The reduction of cell survival was dependent on the time of incubation and on the concentration of ebselen used (Fig. 1A). As a control, we incubated astrocytes in the presence of 100 μ M H_2O_2 , an oxidant with negative effects on cell viability. Under this treatment, cell survival also dropped with the time of incubation (Fig. 1B). Throughout the following experiments, we used 100 μ M ebselen, because it exhibited the highest effect on cell viability.

Effect of ebselen on $[Ca^{2+}]_c$

Perfusion of astrocytes with ebselen (100 μ M), in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium, led to an increase in $[Ca^{2+}]_c$, consisting of an initial transient increase that was then followed by a progressive increase to an elevated value over the prestimulation level (152 cells of 152 total cells studied, $n=4$ experiments; Fig. 2A).

On the other hand, stimulation of astrocytes with ebselen (100 μ M) in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (medium containing 0.5 mM EGTA) induced a transient increase in $[Ca^{2+}]_c$ that was later followed by a slow and progressive increase toward a plateau over the prestimulation level (208 cells of 208 total cells studied, $n=8$ experiments; Fig. 2B). The plateau value of $[Ca^{2+}]_c$ reached under these conditions was lower compared to that observed in the presence of extracellular Ca^{2+} . These results reflect a release of the ion from intracellular stores.

A phenomenon characterized by appearance of irregular bulges, blebbing, at the plasma membrane was observed following the increase in $[Ca^{2+}]_c$, when the cells were stimulated with ebselen (100 μ M) in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium. When astrocytes were stimulated with the antioxidant in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing 0.5 mM EGTA), membrane blebbing was delayed in time, compared to the experiments performed in the presence of extracellular Ca^{2+} . Similar results were obtained when the cells were challenged with ebselen (100 μ M) in the

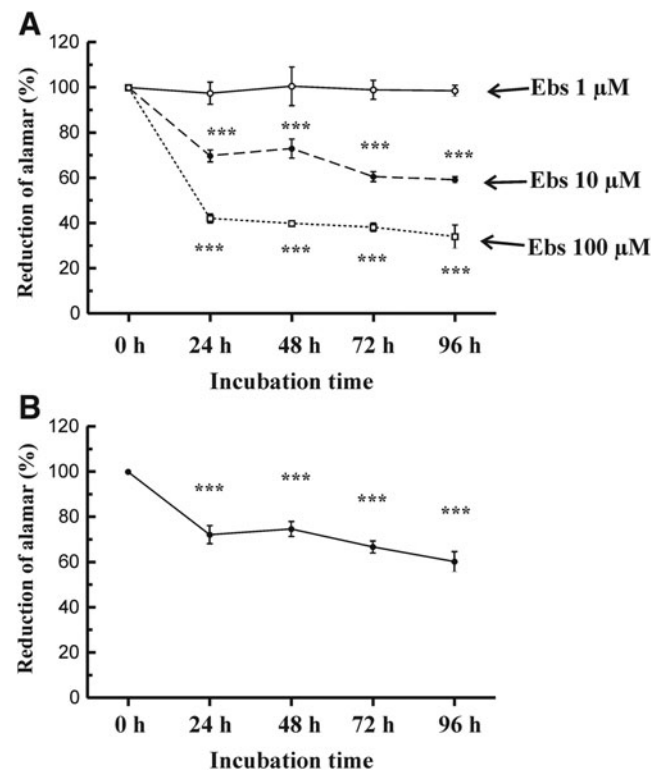


FIG. 1. Analysis of viability of rat hippocampal astrocytes. Cell proliferation and cytotoxicity under the different treatments applied were analyzed studying AlamarBlue[®] reduction, as described in Materials and Methods. **(A)** Incubation of cells in the presence of 1 μ M ebselen did not alter cell viability significantly (continuous line—open circles). However, incubation of cells with 10 μ M (dashed line—full circles) or 100 μ M ebselen (dotted line—open squares) led to a decrease in cell viability compared to unstimulated cells. **(B)** Incubation of cells in the presence of 100 μ M H_2O_2 led to a decrease in cell viability compared to unstimulated cells. Graphics are representative of four independent experiments (Ebs, ebselen; *** $p < 0.001$ for treatments vs. unstimulated cells). Ebselen, 2-phenyl-1,2-benzisoxselenazol-3(2H)-one.

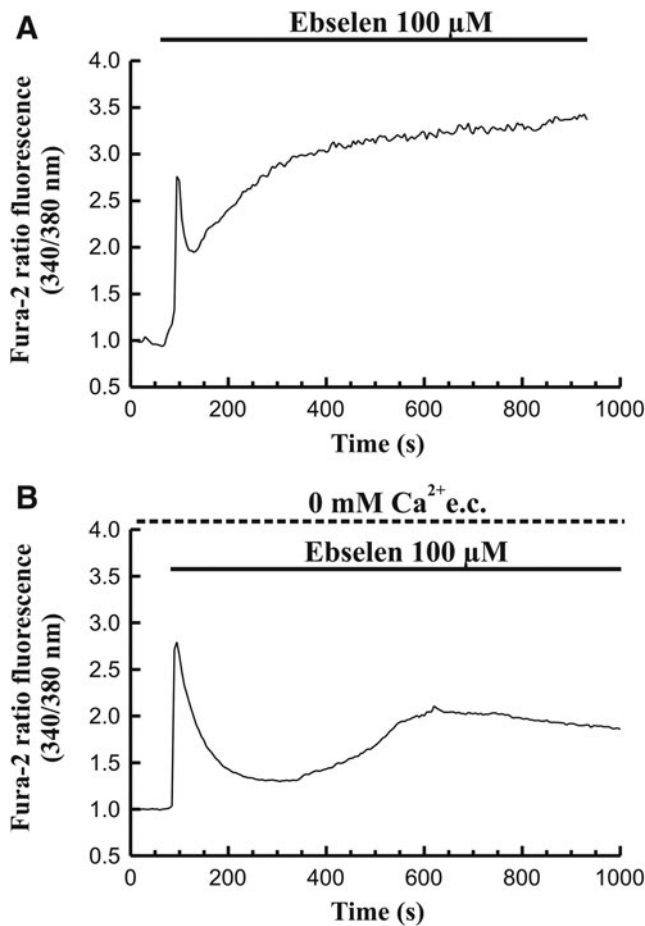


FIG. 2. Monitorization of the effect of ebselen on $[Ca^{2+}]_c$. (A) Time-course of changes in $[Ca^{2+}]_c$ in fura-2-loaded hippocampal rat astrocytes stimulated with $100\ \mu\text{M}$ ebselen, in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium. The horizontal bar indicates the time during which ebselen was applied to the cells. (B) Time course of the effect of $100\ \mu\text{M}$ ebselen on $[Ca^{2+}]_c$ in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing $0.5\ \text{mM}$ EGTA). The horizontal bar indicates the time during which the Ca^{2+} free medium and ebselen were applied to the cells. Traces are representative of 152–208 cells analyzed in four to eight independent experiments. $[Ca^{2+}]_c$, cytosolic free- Ca^{2+} concentration.

additional presence of $10\ \mu\text{M}$ of the intracellular Ca^{2+} chelator dimethyl-BAPTA (data not shown).

Effect of ebselen on mitochondria activity

In our experiments, we employed different fluorescent dyes that selectively accumulate into mitochondria, and report changes in physiological parameters within these organelles. Mitochondria are organelles with a high ability to sequester Ca^{2+} when it is released from the ER. Accumulated Ca^{2+} into mitochondria could mean a stimulatory signal that serves to modify the organelle activity (González *et al.*, 2000; González *et al.*, 2003). Ca^{2+} released by ebselen could then accumulate into mitochondria. As expected, when rhod-2-loaded cells were stimulated with $100\ \mu\text{M}$ ebselen, we observed a transient increase in fluorescence, related to increase in $[Ca^{2+}]_m$. Thereafter, $[Ca^{2+}]_m$ returned

toward a plateau value over the prestimulation level ($n=4$ exp/18 cell/90 mitochondrial areas) (Fig. 3).

On the other hand, the mitochondrial electron transport chain provides the energy that drives the diffusion of protons into the matrix promoting ATP synthesis, and the function of mitochondria depends on the maintenance of a ψ_m . In relation to a change in $[Ca^{2+}]_c$, depolarization of ψ_m occurs, which depends on Ca^{2+} uptake by mitochondria (González *et al.*, 2000; González *et al.*, 2003). Thus, it could be possible that ebselen had an effect on ψ_m . Therefore, we performed a series of experiments in which astrocytes were loaded with the mitochondrion-specific voltage-sensitive dye TMRM. As expected, when cells were perfused with $100\ \mu\text{M}$ ebselen which, as we have shown, induces an increase in both $[Ca^{2+}]_c$ and $[Ca^{2+}]_m$, it could be observed a depolarization of ψ_m ($n=5$ exp/38 cell/190 mitochondrial areas). Under our experimental conditions, there was no recovery of ψ_m (Fig. 4).

The described effects for treatment of cells with $100\ \mu\text{M}$ ebselen on $[Ca^{2+}]_m$ and ψ_m were also observed when astrocytes were incubated in the presence of 20 or $50\ \mu\text{M}$ ebselen (data not shown).

Because prolonged depolarization of mitochondria could be the basis of a mitochondrial stress that could interfere with its functional network, we were also interested in evaluating the distribution of mitochondria within the cells. Localization of mitochondria was assayed by incubation of cells in the presence of MitoTracker Green FM, a dye that selectively accumulates inside these organelles (González *et al.*, 2003). Figure 5A shows a representative fluorescence image of control (unstimulated) astrocytes labeled with MitoTracker Green FM. We could observe a consistent network of mitochondria, which appeared distributed all through the cytosol. Following 5 min-incubation of astrocytes in the presence of $100\ \mu\text{M}$ ebselen, a disruption of the mitochondrial network was observed (Fig. 5B).

In addition, we observed an increase of MitoTracker Green FM-derived fluorescence in the cytosol, following treatment of cells with ebselen (Fig. 5C, continuous line). This was accompanied by a decrease in mitochondrial fluorescence (Fig. 5C, dashed line). This reflects an increase in

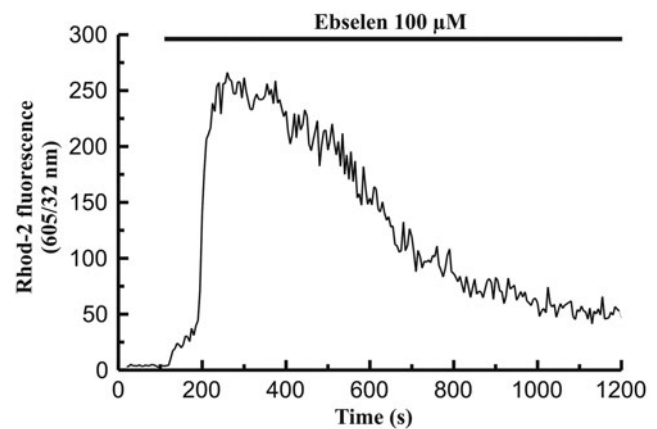


FIG. 3. Effect of ebselen on $[Ca^{2+}]_m$ in rat hippocampal astrocytes. Time course of changes in $[Ca^{2+}]_m$ in response to $100\ \mu\text{M}$ ebselen. A horizontal bar shows the time during which the stimulus was applied to the cells. The graphs are representative of four independent experiments. $[Ca^{2+}]_m$, mitochondrial free- Ca^{2+} concentration.

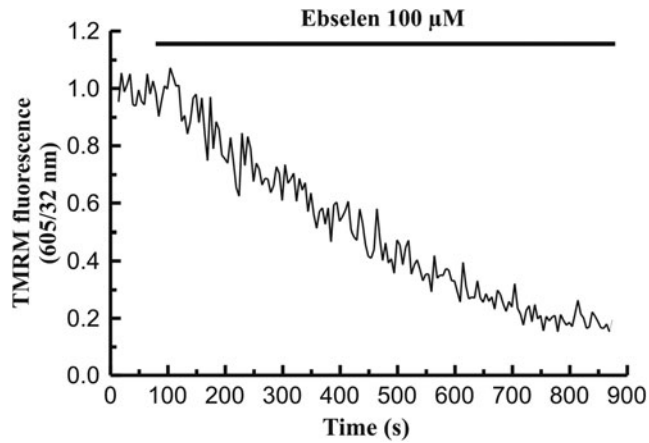


FIG. 4. Effect of ebselen on mitochondrial membrane potential (ψ_m) in rat hippocampal astrocytes. Time course of changes in ψ_m in response to 100 μ M ebselen. A horizontal bar shows the time during which the stimulus was applied to the cells. The graphs are representative of six independent experiments.

mitochondrial membrane permeability that leads to appearance of the dye, which was initially trapped within mitochondria, in the cytosol ($n=5$ exp/17 cell).

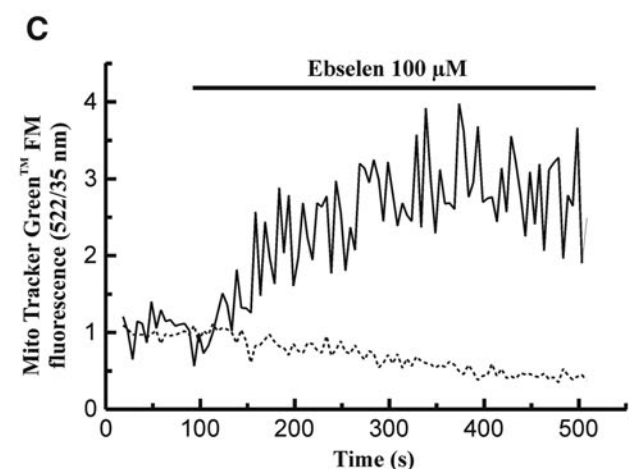
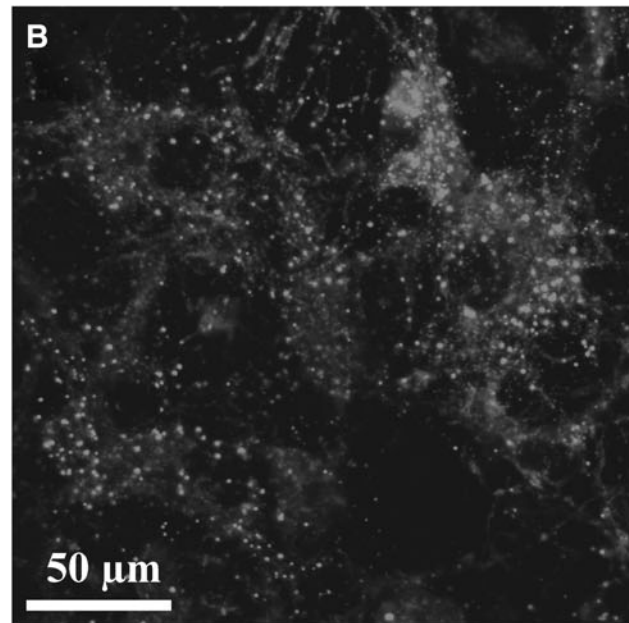
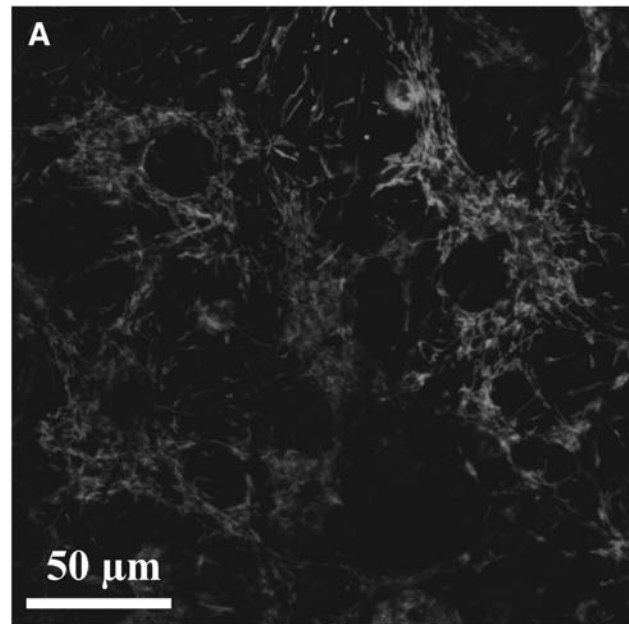
Caspase activity assay

The effect of ebselen that we have observed could be a starting point for the process of apoptosis. Therefore, we examined the effect of the antioxidant on caspase-3 activation. For this purpose, rat hippocampal astrocytes were incubated during 15 min in the presence of 100 μ M ebselen. Under these conditions, we did not observe significant changes in caspase-3 activation ($1.45\% \pm 0.98\%$) compared to unstimulated cells. As a control, treatment of cells with 100 μ M H_2O_2 , a compound that promotes apoptosis (Kaufmann *et al.*, 2003), increased the caspase-3 activity by a $20.50\% \pm 2.25\%$ ($n=5$; $p < 0.001$).

Discussion

Therapy with antioxidants has been extensively used in the treatment of illness in different tissues, including the brain. In this line, the seleno-organic compound ebselen, which was originally developed as an anti-inflammatory

FIG. 5. Confocal microscopy studies of rat hippocampal astrocytes loaded with the fluorescent probe Mito TrackerTM Green FM. Employing confocal laser scanning microscopy, bright fluorescent spots could be detected, being spread all through the cytosolic area. (A) A consistent network of organelles could be observed in unstimulated astrocytes. (B) Effect of 100 μ M ebselen on the mitochondrial network organization. (C) Time course of changes in Mito Tracker Green FM-derived fluorescence in the cytosol (continuous line) and in mitochondria (dashed line) of astrocytes incubated in the presence of 100 μ M ebselen. A horizontal bar shows the time during which the stimulus was applied to the cells. The data are representative of five independent experiments.



agent, has been shown to protect against damage caused by free radicals in the CNS (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004; Green and Ashwood, 2005; Funchal *et al.*, 2006; Gabryel and Małecki, 2006; Ghisleni *et al.*, 2008). However, in spite of the positive effects of ebselen, certain signs were observed in response to selenium-containing compounds that could be the basis of potential damaging actions. In this respect, recent points of epidemiological evidence suggest that overexposure to selenium can facilitate the appearance of chronic degenerative diseases. However, the molecular mechanisms are not fully understood.

It has been shown that selenium-containing compounds are able to open Ca^{2+} release channels at the sarco ER membrane, leading to an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Xia *et al.*, 2004). Moreover, emptying of the Ca^{2+} content in the ER has been related to cell stress and impairment of cell physiology (Fradejas *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). In agreement to this, we have shown in a previous work that ebselen induced Ca^{2+} release from the ER (Salazar *et al.*, 2008).

On the other hand, a leading mechanism of selenium cytotoxicity is a change in the oxidative state of cellular systems, with a resultant production of ROS (Wallenberg *et al.*, 2010).

Mitochondria are organelles with a major function in the cellular oxidative metabolism. The mitochondrial matrix contains many of the central processes of metabolism (Duchen, 2004), depicting Ca^{2+} an important role in mitochondrial physiology (Duchen *et al.*, 2008).

Ebselen mimics glutathione peroxidase, changing therefore the cell redox status (Antony and Bayse, 2011). Selenium can also interact with endogenous -SH groups (Nogueira and Rocha, 2011). Moreover, a range of mitochondrial proteins containing cysteine residues is central to mitochondrial homeostasis, and is sensitive to redox status. And agents that block protein surface thiols can disrupt the activity of enzymes and transporters (Murphy, 2012b). Derived mitochondrial dysfunction has been implicated in cellular disorders (Dröse and Brandt, 2012).

Concentrations of ebselen, ranging from 1 to 40 μM , have been widely employed in actual and past studies on different tissues and cell types, where it shows a protective action (Yamagata *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012). However, as stated in the introduction, ebselen might induce cell death at certain concentrations.

Here we show that ebselen induces Ca^{2+} mobilization from intracellular stores and leads to an elevated $[\text{Ca}^{2+}]_c$, confirming our previous observations (Salazar *et al.*, 2008). The effect of ebselen on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ could not be inhibited by incubation of astrocytes in the absence of extracellular Ca^{2+} , or by incubation of cells in the presence of the intracellular Ca^{2+} chelator dimethyl-BAPTA.

Taking into account the above-mentioned effects of selenium, we hypothesized that the Ca^{2+} -mobilizing action of ebselen could be injurious to the cell, and we investigated its effects on several mitochondrial parameters.

Our results show a transient accumulation of Ca^{2+} into mitochondria, following treatment of cells with ebselen. Thus, ebselen treatment might induce changes in mitochondrial function.

In addition to $[\text{Ca}^{2+}]_m$, in our study, we have also noticed changes in other mitochondrial parameters in the presence of ebselen. First, we have observed a depolarization of ψ_m .

In a former work, it has been shown that selenium can potentially influence the activity and function of oxidoreductases within the cell (Wallenberg *et al.*, 2010). These proteins carry out a central function in maintaining the redox balance within the cell, and their imbalance can contribute to selenium toxicity. Indeed, a recent work has shown that ebselen caused a statistically significant inhibition of the mitochondrial complexes I and II activity, an effect completely reversed by reduced glutathione (Puntel *et al.*, 2013). The authors suggest that ebselen-induced mitochondrial complexes I and II inhibition can be mediated by a thiol oxidation activity, that is, ebselen can oxidize critical thiol groups from mitochondrial complexes I and II. As a consequence, inhibition of mitochondrial respiratory chain complexes will lead to mitochondrial depolarization, as we have observed.

Second, we have also observed a disruption of mitochondrial network. Mitochondria form a dynamic network responsible for energy production, Ca^{2+} homeostasis, and cell signaling. Appropriate distribution of the mitochondrial network contributes to organelle function and is essential for cell survival (Frederick and Shaw, 2007). Additionally, redistribution of mitochondria within the cell can be a component of regulatory pathways (Murphy, 2012b). It has been proposed that fragmentation of the mitochondrial network is related neurodegeneration (Almajan *et al.*, 2012). In agreement to these observations, the effect of ebselen on mitochondrial network could be deleterious to astrocyte physiology.

And third, ebselen induced an increase in mitochondrial membrane permeability. A common process associated with oxidative stress and severe mitochondrial impairment is the increase in mitochondrial membrane permeability, as described in many neurodegenerative diseases (Eckmann *et al.*, 2013). The consequences of such an alteration of mitochondrial physiology are not uncommon. As expected, ebselen induces a decrease in cell viability.

In a previous work, we have shown that ebselen (1–10 μM) did not alter the integrity of the cellular membrane of astrocytes, indicated as absence of lactate dehydrogenase release to the extracellular medium. However, in the presence of 20 μM ebselen, it was detectable a slight, but significant decrease of astrocyte viability (Salazar *et al.*, 2008).

In the present study, we demonstrate that cell viability is decreased in the presence of ebselen, as reflected by the studies on the reducing power of living cells. The analysis employing the growth indicator AlamarBlue, are based on the detection of cellular metabolism. Its active compound resazurin is effectively reduced in mitochondria, making it useful also to assess the mitochondrial metabolic activity. Thus, in addition to its utility as a marker of diminished cell viability, the decreased reduction of AlamarBlue that we have observed is an index of decreased mitochondrial function. Therefore, our observations agree with a deleterious action of ebselen on cell survival, which might be a consequence of the evoked changes in mitochondrial physiology that we have observed.

On the other hand, we did not observe involvement of the caspase-3 activity in the actions of ebselen. In our hands, the effects of this compound could be early ones that might lead to an impairment of mitochondrial function that, in turn, could impair cellular homeostasis and induce cell damage without involving apoptosis.

In conclusion, our results confirm that ebselen induces changes in mitochondrial parameters that could compromise the function of the major energy synthesizing factory within the cell. If mitochondrial homeostasis is impaired, then astrocyte function and survival could be compromised. Causing mitochondrial dysfunction may be considered an important factor in the toxicity of ebselen.

Acknowledgments

Funding for this study was provided by Plan Regional de Investigación Sanitaria 2010 (PRIS10014) and Junta de Extremadura-FEDER (GR10010). Patricia Santofimia-Castaño was granted a fellowship from Junta de Extremadura and European Social Fund. The funding source(s) had no further role in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication. The authors would like to thank Mrs. Mercedes Gómez Blázquez for her valuable technical assistance.

Disclosure Statement

The authors declare that there is no conflict of interests.

References

- Almajan, E.R., Richter, R., Paeger, L., Martinelli, P., Barth, E., Decker, T., Larsson, N.G., Kloppenburg, P., Langer, T., and Rugarli, E.I. (2012). AFG3L2 supports mitochondrial protein synthesis and Purkinje cell survival. *J Clin Invest* **122**, 4048–4058.
- Antony, S., and Bayse, C.A. (2011). Modeling the mechanism of the glutathione peroxidase mimic ebselen. *Inorg Chem* **50**, 12075–12084.
- Araque, A., Carmignoto, G., and Haydon, P.G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* **63**, 795–813.
- Avila, D.S., Benedetto, A., Au, C., Manarin, F., Erikson, K., Soares, F.A., Rocha, J.B., and Aschner, M. (2012). Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **52**, 1903–1910.
- Brown, R.D., Burke, G.A., and Brown, G.C. (2009). Dependence of leukemic cell proliferation and survival on H₂O₂ and L-arginine. *Free Radic Biol Med* **46**, 1211–1220.
- Centurião, F.B., Corte, C.L., Paixão, M.W., Braga, A.L., Zeni, G., Emanuelli, T., and Rocha, J.B. (2005). Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. *Brain Res* **1039**, 146–152.
- Deng, W., Baki, L., Yin, J., Zhou, H., and Baumgarten, C.M. (2010). HIV protease inhibitors elicit volume-sensitive Cl⁻ current in cardiac myocytes via mitochondrial ROS. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 746–752.
- Dröse, S., and Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* **748**, 145–169.
- Du, Y., Zhang, H., Lu, J., and Holmgren, A. (2012). Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J Biol Chem* **287**, 38210–38219.
- Duchen, M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* **25**, 365–451.
- Duchen, M.R., Verkhatsky, A., and S. (2008). Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium* **44**, 1–5.
- Eckmann, J., Eckert, S.H., Leuner, K., Muller, W.E., and Eckert, G.P. (2013). Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 76–80.
- Eysseric, H., Gonthier, B., Soubeyran, A., Richard, M.J., Develoosse, D., and Barret, L. (2000). Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* **21**, 117–125.
- Fradejas, N., Pastor, M.D., Burgos, M., Beyaert, R., Tranque, P., and S. (2010). Caspase-11 mediates ischemia-induced astrocyte death: involvement of endoplasmic reticulum stress and C/EBP homologous protein. *J Neurosci Res* **88**, 1094–1105.
- Frederick, R.L., and Shaw, J.M. (2007). Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* **8**, 1668–1675.
- Fujisawa, S., and Kadoma, L. (2005). Kinetic studies of the radical scavenging activity of ebselen, a seleno-organic compound. *Anticancer Res* **25**, 3989–3994.
- Funchal, C., Moretto, M.B., Vivian, L., Zeni, G., Rocha, J.B., and Pessoa-Pureur, R. (2006). Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* **222**, 143–153.
- Gabryel, B., and A. (2006). Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. *Pharmacol Rep* **58**, 381–392.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L.O., Mioranza, S., Boeck, C.R., Rocha, J.B., and Souza, D.O. (2008). Selenium compounds counteract the stimulation of ecto-nucleotidase activities in rat cultured cerebellar granule cells: putative correlation with neuroprotective effects. *Brain Res* **1221**, 134–140.
- González, A., Granados, M.P., Pariente, J.A., and Salido, G.M. (2006). H₂O₂ mobilizes Ca²⁺ from agonist- and thapsigargin-sensitive and insensitive intracellular stores and stimulates glutamate secretion in rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* **31**, 741–750.
- González, A., Granados, M.P., Salido, G.M., and J.A. (2003). Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **15**, 1039–1048.
- González, A., Schmid, A., Salido, G.M., Camello, P.J., and Pariente, J.A. (2002). XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **14**, 153–159.
- González, A., Schulz, I., and A. (2000). Agonist-evoked mitochondrial Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **275**, 38680–38686.
- Green, A.R., and Ashwood, T. (2005). Free radical trapping as a therapeutic approach to neuroprotection in stroke: experimental and clinical studies with NXY-059 and free radical scavengers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 109–118.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440–3450.
- Hassan, W., Ibrahim, M., and Rocha, J.B. (2010). Diphenyl diselenide behaves differently than ebselen under different pH media in rat's liver preparations. *Pathol Res Pract* **206**, 357–360.
- Kaufmann, J.A., Perez, M., Zhang, W., Bickford, P.C., Holmes, D.B., and Tagliatela, G. (2003). Free radical-dependent nuclear localization of Bcl-2 in the central nervous system of aged

- rats is not associated with Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J Neurochem* **87**, 981–994.
- Kim, Y.H., Joo, H.S., and Kim, D.S. (2010). Nitric oxide induction of IRE1-alpha-dependent CREB phosphorylation in human glioma cells. *Nitric Oxide* **23**, 112–120.
- Murphy, M.P. (2012a). Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxid Redox Signal* **16**, 476–495.
- Murphy, M.P. (2012b). Modulating mitochondrial intracellular location as a redox signal. *Sci Signal* **5**, pe39.
- Nogueira, C.W., and Rocha, J.B. (2011). Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* **85**, 1313–1359.
- Pérez-Ortiz, J.M., Tranque, P., Vaquero, C.F., Domingo, B., Molina, F., Calvo, S., Jordán, J., Ceña, V., and Llopis, J. (2004). Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* **279**, 8976–8985.
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., and Rocha, J.B. (2013). Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol In Vitro* **27**, 59–70.
- Salazar, M., Pariente, J.A., Salido, G.M., and González, A. (2008). Ebselen increases cytosolic free Ca²⁺ concentration, stimulates glutamate release and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Toxicology* **244**, 280–291.
- Seo, J.Y., Lee, C.H., Cho, J.H., Choi, J.H., Yoo, K.Y., Kim, D.W., Park, O.K., Li, H., Choi, S.Y., Hwang, I.K., vWon, M.H. (2009). Neuroprotection of ebselen against ischemia/reperfusion injury involves GABA shunt enzymes. *J Neurol Sci* **285**, 88–94.
- Sies, H. (1993). Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* **14**, 313–323.
- Wallenberg, M., Olm, E., Hebert, C., Björnstedt, M., and Fernandes, A.P. (2010). Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. *Biochem J* **429**, 85–93.
- Xia, R., Ganther, H.E. Egge, A., and Abramson, J.J. (2004). Selenium compounds modulate the calcium release channel/ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle by oxidizing functional thiols. *Biochem Pharmacol* **67**, 2071–2079.
- Yamagata, K., Ichinose, S., Miyashita, A., and Tagami, M. (2008). Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience* **153**, 428–435.
- Yang, C.F., Shen, H.M., and Ong, C.N. (2000). Ebselen induces apoptosis in HepG2 cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch Biochem Biophys* **374**, 142–152.
- Yue, W.Y., Clark, J.J., Fernando, A., Domann, F., and Hansen, M.R. (2011). Contribution of persistent C-Jun N-terminal kinase activity to the survival of human vestibular schwannoma cells by suppression of accumulation of mitochondrial superoxides. *Neuro Oncol* **13**, 961–973.

Address correspondence to:
Antonio González, PhD
Cell Physiology Research Group
Department of Physiology
University of Extremadura
Avenida Universidad s/n
E-10003 Cáceres
Spain

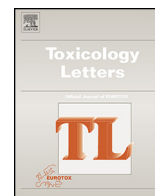
E-mail: agmateos@unex.es

Received for publication December 9, 2012; received in revised form February 6, 2013; accepted February 12, 2013.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

The seleno-organic compound ebselen impairs mitochondrial physiology and induces cell death in AR42J cells



Patricia Santofimia-Castaño^a, Lourdes Garcia-Sanchez^a, Deborah Clea Ruy^b, Miguel Fernandez-Bermejo^c, Gines M. Salido^a, Antonio Gonzalez^{a,*}

^a Cell Physiology Research Group, Department of Physiology, University of Extremadura, Avenida Universidad s/n, Caceres E-10003, Spain

^b Faculdade de Agronomia & Medicina Veterinaria, Universidade de Brasilia, 70900-100, Brasilia DF, Brazil

^c Department of Gastroenterology, San Pedro de Alcantara Hospital, E-10003, Caceres, Spain

HIGHLIGHTS

- Ebselen causes cell death in several cancer cell types.
- The mechanisms underlying its deleterious effects have not been elucidated yet.
- Ebselen decreases the viability of pancreatic cancer cells.
- Ebselen's actions involve the impairment of mitochondrial physiology.
- Ebselen activates caspase-3-mediated apoptotic pathway.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2014

Received in revised form 22 July 2014

Accepted 23 July 2014

Available online 26 July 2014

Keywords:

Ebselen
Calcium
Cell cycle
Red-ox state
Proliferation
Cancer

ABSTRACT

Ebselen is a seleno-organic compound that causes cell death in several cancer cell types. The mechanisms underlying its deleterious effects have not been fully elucidated. In this study, the effects of ebselen (1 μM–40 μM) on AR42J tumor cells have been examined. Cell viability was studied using AlamarBlue[®] test. Cell cycle phase determination was carried out by flow cytometry. Changes in intracellular free Ca²⁺ concentration were followed by fluorimetry analysis of fura-2-loaded cells. Distribution of mitochondria, mitochondrial Ca²⁺ concentration and mitochondrial membrane potential were monitored by confocal microscopy of cells loaded with Mitotracker Green[™] FM, rhod-2 or TMRM respectively. Caspase-3 activity was calculated following the fluorogenic substrate ACDEVD-AMC signal with a spectrofluorimeter. Results show that cell viability decreased in the presence of ebselen. An increase in the number of cells in the S-phase of the cell cycle was observed. Ebselen induced a concentration-dependent mobilization of Ca²⁺ from agonist- and thapsigargin-sensitive Ca²⁺ pools. Ebselen induced also a transient increase in mitochondrial Ca²⁺ concentration, a progressive decrease of the mitochondrial membrane potential and a disruption of the mitochondrial network. Finally, a concentration-dependent increase in caspase-3 activity was detected. We conclude that ebselen exerts deleterious actions on the cells that involve the impairment of mitochondrial physiology and the activation of caspase-3-mediated apoptotic pathway.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The seleno-organic compound 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one (ebselen) is a substance with radical scavenging activity.

Its main effects involve attenuation of free radical generation, detoxification of free radicals and of the toxic products of their reactions. The actions of ebselen are mediated through its antioxidant and glutathione peroxidase-mimic properties

Abbreviations: CCK-8, cholecystokinin octapeptide; [Ca²⁺]_i, intracellular free Ca²⁺ concentration; CM-H2DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester; Ebselen, 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; ER, endoplasmic reticulum; Fura-2/AM, fura-2 acetoxymethyl ester; H₂O₂, hydrogen peroxide; SERCA, sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; Tps, thapsigargin.

* Corresponding author. Tel.: +34 927 257000x51377; fax: + 34 927 257110.

E-mail address: agmateos@unex.es (A. Gonzalez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.025>

0378-4274/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

(Fujisawa and Kadoma, 2005). Therefore, it has been extensively employed as a putative therapeutic agent in a number of tissues, notably in brain ischemia and stroke (Dalla Corte et al., 2012; Wei et al., 2014). Beneficial effects of ebselen in other tissues and cellular systems have also been reported. For example, the compound ameliorates deterioration of β -cell mass and function in type 2 diabetes (Mahadevan et al., 2013) and has anti-immunosenescent potential in T cells (Marthandan et al., 2013). Ebselen has also protective effects in hypoxic pulmonary vasoconstriction (Connolly et al., 2013) and in endothelial cells (de Bem et al., 2013).

The selenium in ebselen is not bioavailable, because it is not released, and ebselen metabolites are excreted in bile and urine. Therefore, toxic effects of this drug were unexpected (Parnham and Sies, 2013). Nevertheless, experimental evidence shows that ebselen causes cell death in several cancer cell types, but the underlying mechanism has not been fully elucidated (Zhang et al., 2014). Ebselen induces also toxicity and causes cell death in non-tumor cells. Ebselen induces astrocyte reactivity, which is characterized by a dose-dependent increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), glutamate release and an increase in the content of glial fibrillary acidic protein (Salazar et al., 2008). The seleno-organic compound impairs mitochondrial physiology and reduces viability of hippocampal astrocytes (Santofimia-Castaño et al., 2013).

It has been suggested that the mechanism of action believed to underlie the toxicity of selenium-containing compounds involves intracellular red-ox modulation. However, variations in cell death mechanisms, depending on the molecular structure of the selenium compound and on the cellular system, have been proposed (Stewart et al., 1999).

Bearing in mind the recently reported biological activities of this compound, the aim of the present work was to shed more light onto the mechanisms by which ebselen might cause cell toxicity. Here we provide evidences for a putative *janus* face of ebselen, a seleno-organic compound that might lead to detrimental consequences in cell physiology.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

AR42J cell line (ECACC No. 93100618) derived from exocrine pancreatic rat tumor was purchased from The European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Dorset, UK). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from HyClone (Thermo Scientific, Erembodegen, Belgium). Glutamine, RPMI 1640 medium and penicillin/streptomycin were obtained from BioWhittaker (Lonza, Basel, Switzerland). 1,2-bis(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester (dimethyl BAPTA), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), cholecystokinin fragment 26–33 amide (CCK-8), dexamethasone, dithiothreitol, 2-phenyl-1,2-benzisoxazol-3(2H)-one (ebselen), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), hydrogen peroxide (H_2O_2), *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (ACDEVD-AMC), *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), propidium iodide, ribonuclease A, thapsigargin and Tween[®]-20 were obtained from Sigma Chemicals Co. (Madrid, Spain). AlamarBlue[®] was purchased from AbD serotec (bioNova Científica, Madrid, Spain). 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA), fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM), MitoTracker[™] Green FM, rhod-2 acetoxymethyl ester (rhod-2/AM), tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM), and trypsin-ethylenediaminetetraacetic

acid (Trypsin-EDTA) were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Preparation of AR42J cells cultures

Cultures were prepared following previously described methods (del Castillo-Vaquero et al., 2010). Briefly, cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 10% FBS and antibiotics (0.1 mg/mL streptomycin, 100 IU penicillin), and were maintained at 37 °C under a humidified condition of 95% air and 5% CO_2 . Cells were routinely plated at a density of approximately 10^5 cells/mL in 75-cm² flasks, and were allowed to grow until confluence was reached (approx. 7–9 days). Thereafter, the cells were detached by 5 min. incubation in Hanks' Balanced Salt Solution containing Trypsin-EDTA and reseeded.

For cell viability studies, cell cycle analysis and the determination of caspase-3 activation, the cells were seeded on multiwell plates (6 well; 10^5 cells/well). For intracellular free Ca^{2+} concentration determination ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), the cells were reseeded in 75-cm² flasks. For the studies of mitochondrial physiology the cells were reseeded onto glass coverslips (10^4 cells/coverslip) placed in independent dishes (35 mm diameter).

In all cases cells were incubated in culture medium in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO_2 , and were allowed to grow until confluence was reached. Forty-eight hours prior to use, cells were incubated in culture medium supplemented with 100 nM dexamethasone (Eum et al., 2003), and then the cells were used for the experiments.

2.3. Cell viability assay

Analysis of cell survival under the different treatments applied was performed using AlamarBlue[®] test, as previously described (Santofimia-Castaño et al., 2013). Stimuli were added to the cells at the desired concentration. Cell viability was estimated by measuring cellular fluorescence at 530 nm/590 nm (excitation/emission) using an ELISA spectrofluorimeter (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria). Data show the mean reduction of AlamarBlue[®] expressed in percentage \pm S.E.M. (*n*) with respect to non-stimulated cells, where *n* is the number of independent experiments.

2.4. Flow cytometry and cell cycle analysis

Determination of the cell cycle phase was carried out following Vindelov's method (Seamer et al., 1993). Cells were incubated for 5 days in the presence of the stimuli. Next, the cells were washed with a PBS (containing: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4), detached, and incubated in Vindelov's reagent supplemented with propidium iodide. Samples were incubated for 1 h on ice and protected from light (Clemens et al., 2003). The cells were then analyzed in a flow cytometer to determine cell cycle phase. Each sample was analyzed in triplicate for 10^4 events. The flow cytometry analysis was performed on a FACScan cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cell Quest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was employed to determine the fractions of the cell population in each phase of the cycle (G_0/G_1 , S, and G_2/M). Data show the number of cells under each phase of the cell cycle, expressed in percentage \pm S.E.M. (*n*) with respect to non-stimulated cells, where *n* is the number of independent experiments.

2.5. Determination of intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$)

Monitoring of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was performed as previously described (Rivera-Barreno et al., 2010). Cells were detached and resuspended in Na-HEPES buffer (composition: 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl,

1.3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM glucose; pH adjusted to 7.4). Next, cells were loaded with fura-2/AM (4 μM) at room temperature (23–25 °C) for 40 min, as described previously (Gonzalez et al., 1999). Changes in fura-2-derived fluorescence closely report changes in [Ca²⁺]_c (Gryniewicz et al., 1985).

Changes in fluorescence signals were monitored by placing aliquots of dye-loaded cells into a cuvette in a fluorescence spectrofluorimeter (RF-5001-PC; Shimadzu, Kyoto, Japan). Cells were stirred continuously and experiments were performed at 37 °C. Fura-2-loaded cells were excited alternatively at 340 and 380 nm and fluorescence emission was measured at 505 nm. All stimuli were dissolved in the extracellular Na–HEPES buffer, with or without Ca²⁺, and were added directly into the cuvette to yield the final concentration required. Results are expressed as the ratio of fluorescence emitted at both excitation wavelengths, previously normalized to the basal (resting) fluorescence. In experiments in which Ca²⁺-free medium was used, Ca²⁺ was omitted from the extracellular solution and 500 μM EGTA was added.

2.6. Localization of mitochondria and determination of mitochondrial-free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_m)

Localization of mitochondria within AR42 cells was assayed by incubation of cells in the presence of MitoTracker™ Green FM. Loading of cells with MitoTracker™ Green FM (100 nM) was performed at room temperature (23–25 °C) for 30 min. This dye has been widely employed as a mitochondrial marker.

Changes in mitochondrial Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_m) were detected following previously described methods (Gonzalez et al., 2003). Briefly, cells were loaded with rhod-2/AM (8 μM) at 4 °C for 15 min. After incubation with rhod-2/AM, the extracellular medium was replaced by fresh Na–Hepes buffer, and cells were incubated at room temperature (23–25 °C) for 30 min. For monitoring fluorescence signals, coverslips with dye-loaded cells were placed in a perfusion chamber located on the stage of an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE300 microscope; Nikon Instruments Inc.) and continuously superfused with Na–Hepes buffer. Fluorescence images from cells loaded with rhod-2 were obtained employing a confocal laser scanning system Bio-Rad MRC 1024 (American Laser Corp., Salt Lake City, UT, USA). Using a ×60 oil immersion objective, fluorescence images of 256 × 256 pixels with a resolution of 0.215 μM/pixel were recorded every 5 s. Excitation light at 543 nm from a 25 mW helium–neon laser was employed. Emitted fluorescence was collected through a 605/32 nm band-pass filter, employing different photomultipliers. Neutral density filters had to be employed to reduce laser intensity to 0.3–1% and diminish photobleaching. The software used for the imaging was Laser Sharp MRC-1024 Version 3.2 (Bio-Rad Deisenhofen, Germany). Results are expressed as the absolute values of fluorescence emitted. Data were normalized to the basal (resting) fluorescence values.

2.7. Mitochondrial membrane potential determination

Changes in mitochondrial membrane potential (Ψ_m) were recorded using the dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) as described previously (Gonzalez et al., 2003). AR42J cells were incubated during 30 min in the presence of 50 nM TMRM at 37 °C. At this concentration a decrease in TMRM fluorescence reflects depolarization of Ψ_m, because of diffusion of the dye to the cytosol. No TMRM was added to the medium after the initial loading period.

For monitoring fluorescence signals, coverslips with dye-loaded cells were placed in a perfusion chamber located on the stage of an inverted fluorescence microscope (see details above) and

continuously superfused with Na–Hepes buffer. Fluorescence images from cells loaded with TMRM were obtained using the laser scanning confocal microscope already mentioned. TMRM was excited by the 543 nm line of a 25 mW helium–neon laser, and emission was collected through a 605/32 nm band-pass filter. Results are expressed as the absolute values of fluorescence emission at the excitation wavelength employed. Data were normalized to the basal (resting) fluorescence values.

2.8. Caspase-3 activity assay

To determine caspase-3 activity, stimulated or resting cells were sonicated and cell lysates were incubated for 1 h at 37 °C with 2 mL of substrate solution containing: 20 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 5 mM dithiothreitol and 8.25 μM of caspase-3 substrate.

The activity of caspase-3 was calculated from the cleavage of the specific fluorogenic substrate (AC-DEVDAMC). Fluorescence was measured using an ELISA spectrofluorimeter (Tecan Infinite M200, Grödig, Austria). Samples were excited at a wavelength of 360 nm and emission was detected at 460 nm. The data were calculated as fluorescence units per milligram of protein, and are presented as percentage ± S.E.M. (*n*) with respect to non-stimulated cells, where *n* is the number of independent experiments.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test, and only *P* values < 0.05 were considered statistically significant. For individual comparisons and statistics between individual treatments we employed Student's *t*-test, and only *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of ebselen on cell viability

AR42J cells were incubated in the presence of no stimulus (control cells) or in the presence of 1 μM, 10 μM, 20 μM or 40 μM ebselen. Cell viability was evaluated at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h of incubation. Viability of non-stimulated cells did not vary during the time of incubation and was estimated 100% (*n* = 5 experiments). Incubation with 1 μM ebselen did not alter significantly cell viability (Fig. 1; open circles). However, in the presence of higher concentrations of ebselen a significant reduction of cell viability compared with control cells was observed. The effect was more noticeable when the cells were incubated in the presence of 40 μM ebselen (Fig. 1; ebselen 10 μM, full triangles; ebselen 20 μM, open squares; and ebselen 40 μM, full squares). Cells were also incubated in the presence of 1 μM thapsigargin (Tps), a cell death inducer (Nath et al., 1997). Tps induced a time-dependent drop in cell viability compared with control cells (Fig. 1; full circles).

3.2. Effect of ebselen on the cell-cycle

AR42J cells were treated for 72 h with increasing concentrations of ebselen (1–40 μM), and the ability of cells to pass through the cell cycle was investigated. A group of cells were cultured for 72 h in the absence of ebselen, and were employed as a control (untreated cells) for comparisons. The results revealed that approximately 83.27% of untreated cells were under the G₀/G₁ phase, 13.36% of cells were under the S-phase, whereas 3.76% of

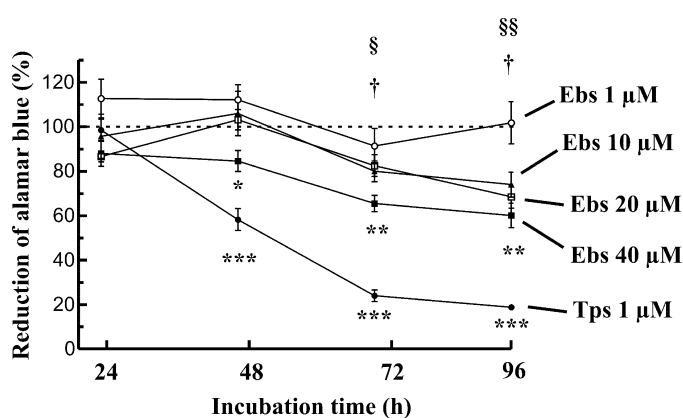


Fig. 1. Analysis of viability of AR42J cells. Cell proliferation and cytotoxicity were analyzed studying AlamarBlue[®] reduction by viable cells, as described in "Section 2." Cells were incubated in the presence of 1 μ M (open circles), 10 μ M (full triangles), 20 μ M (open squares) or 40 μ M (full squares) ebselen (Ebs), and viability was compared with that of cells in the absence of stimulus. In other set of experiments, cells were incubated with 1 μ M Tps (full circles). The horizontal dashed line represents the viability of non-stimulated cells, which was considered 100%. Data are representative of four to five independent experiments (Ebs 10 μ M: §, $P < 0.05$; §§, $P < 0.01$ vs untreated cells. Ebs 20 μ M: †, $P < 0.05$ vs untreated cells. Ebs 40 μ M: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs untreated cells. Tps: ***, $P < 0.001$ vs untreated cells).

cells were in the G_2/M transition of the cell cycle (Fig. 2A). In comparison with untreated cells, no significant changes in the percentage of cells under each phase of the cell cycle could be detected in the presence of 1 μ M ebselen (Fig. 2B). When AR42J cells were incubated in the presence of 10 μ M, 20 μ M or 40 μ M ebselen a statistically significant reduction in the percentage of cells in the G_0/G_1 phase was noticed; whereas an increase in the percentage of cells under S-phase was observed (Fig. 2C–E). Finally, the percentage of cells in G_2/M phase of the cell cycle remained unchanged, compared with the values observed in untreated cells.

Cells were also incubated in the presence of Tps a compound that inhibits cell cycle (Cai et al., 2013). In the presence of Tps a drop in the percentage of cells in the G_0/G_1 phase was detected, which was paralleled by an increase in the percentage of cells under S-phase. The percentage of cells in the G_2/M phase was not statistically different from the value observed in untreated cells (Fig. 2F). In all groups studied, the increase in the percentage of cells in the S-phase seemed to occur at the expense of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle, which was smaller in cells incubated with ebselen or Tps in comparison with the values observed in untreated cells. These data indicate that ebselen might influence the cell cycle and might decrease cell proliferation.

3.3. Effects of ebselen on intracellular free- Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$)

AR42J cells contain functional Ca^{2+} stores from which the ion is released upon stimulation with Ca^{2+} -mobilizing agonists. Incubation of fura-2-loaded AR42J cells with 1 nM CCK-8 in the presence of extracellular Ca^{2+} led to the typical transient Ca^{2+} mobilization evoked by the agonist. Ca^{2+} mobilization consisted of an initial increase, followed by a decrease of $[Ca^{2+}]_i$ towards a value over the prestimulation level ($n = 5$ independent experiments; Fig. 3A).

When the cells were challenged with ebselen (1–40 μ M) in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium, a progressive increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed. $[Ca^{2+}]_i$ remained elevated over the basal level. The effect of ebselen was concentration-dependent (Fig. 3B). In order to investigate the source for Ca^{2+} mobilization evoked by ebselen, we evaluated whether ebselen mobilizes Ca^{2+} from the agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} pools. Thus, the cells

were additionally stimulated with 1 nM CCK-8. In the presence of 1 μ M or 10 μ M ebselen Ca^{2+} mobilization by CCK-8 (1 nM) was largely reduced, whereas in the presence of 20 μ M or 40 μ M ebselen, CCK-8 failed to induce further mobilization of Ca^{2+} (Fig. 3B; $n = 4$ –5 independent experiments).

To avoid the contribution of extracellular Ca^{2+} to ebselen or CCK-8-induced Ca^{2+} responses, cells were stimulated in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (medium containing 500 μ M EGTA). Now Ca^{2+} responses will depend on the release of the ion from intracellular stores. In this group of experiments we employed 40 μ M ebselen, because it was the concentration that elicited the highest Ca^{2+} response. Stimulation of AR42J cells with 1 nM CCK-8 in the absence of extracellular Ca^{2+} led to the typical transient change in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4A). The additional incubation of cells with ebselen (40 μ M) still was able to release Ca^{2+} from the intracellular stores (Fig. 4A; $n = 3$ independent experiments). However, the response evoked by ebselen was smaller compared with that observed when the compound was applied to the cells alone. Next, we inverted the order of the stimuli. Incubation of AR42J cells with 40 μ M ebselen, in the absence of extracellular Ca^{2+} , induced the release of Ca^{2+} from the intracellular stores (Fig. 4B). The previous application of ebselen blocked any additional mobilization of Ca^{2+} in response to CCK-8 (Fig. 4B; $n = 6$ independent experiments).

To additionally investigate the source for Ca^{2+} release in response to ebselen, we performed a series of experiments in which the cells were incubated in the presence of 1 μ M thapsigargin (Tps). Tps is a potent selective sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor, and is often used to estimate the Ca^{2+} pool content (Nielsen et al., 1995). Due to the inhibition of SERCA, Tps leads to Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum (ER) (Dallwig and Deitmer, 2002). Incubation of the cells with the SERCA-inhibitor (1 μ M) in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium induced a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$, which later on decreased towards a value over the prestimulation level (Fig. 5A; $n = 5$ independent experiments). Next, we evaluated whether ebselen released Ca^{2+} from Tps-sensitive Ca^{2+} pools. Thus, the cells were sequentially stimulated with ebselen and Tps. Stimulation of cells with ebselen (1–40 μ M), prior to Tps stimulation, led to a progressive increase in $[Ca^{2+}]_i$ that remained elevated over the basal level. In the presence of 1 μ M ebselen Ca^{2+} mobilization by Tps (1 μ M) was largely reduced; whereas in the presence of 10 μ M, 20 μ M or 40 μ M ebselen the response evoked by the SERCA inhibitor (1 μ M) was completely inhibited (Fig. 5B; $n = 4$ independent experiments).

Again, to avoid the contribution of extracellular Ca^{2+} to ebselen or Tps-induced Ca^{2+} responses, we stimulated the cells in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (medium containing 500 μ M EGTA). We employed 40 μ M ebselen to perform these studies. In the presence of the SERCA-inhibitor (1 μ M) and in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium (medium containing 500 μ M EGTA) a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed, which decreased towards the prestimulation level. This response reflects a release of the ion from the ER (Fig. 6A). The additional stimulation of cells with ebselen (40 μ M) still was able to induce further release of Ca^{2+} from intracellular stores (Fig. 6A; $n = 3$ independent experiments). Nevertheless, the response obtained was smaller compared with that observed when ebselen (40 μ M) was applied to the cells alone. We inverted also the order of the stimuli. Incubation of the cells with 40 μ M ebselen, in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing 500 μ M EGTA) led to the release of Ca^{2+} from the intracellular stores (Fig. 6B). The previous application of ebselen blocked any additional mobilization of Ca^{2+} by Tps (Fig. 6B; $n = 4$ independent experiments).

Because the experiments were carried out in the absence of Ca^{2+} in the extracellular medium, and neither CCK-8 nor Tps were able

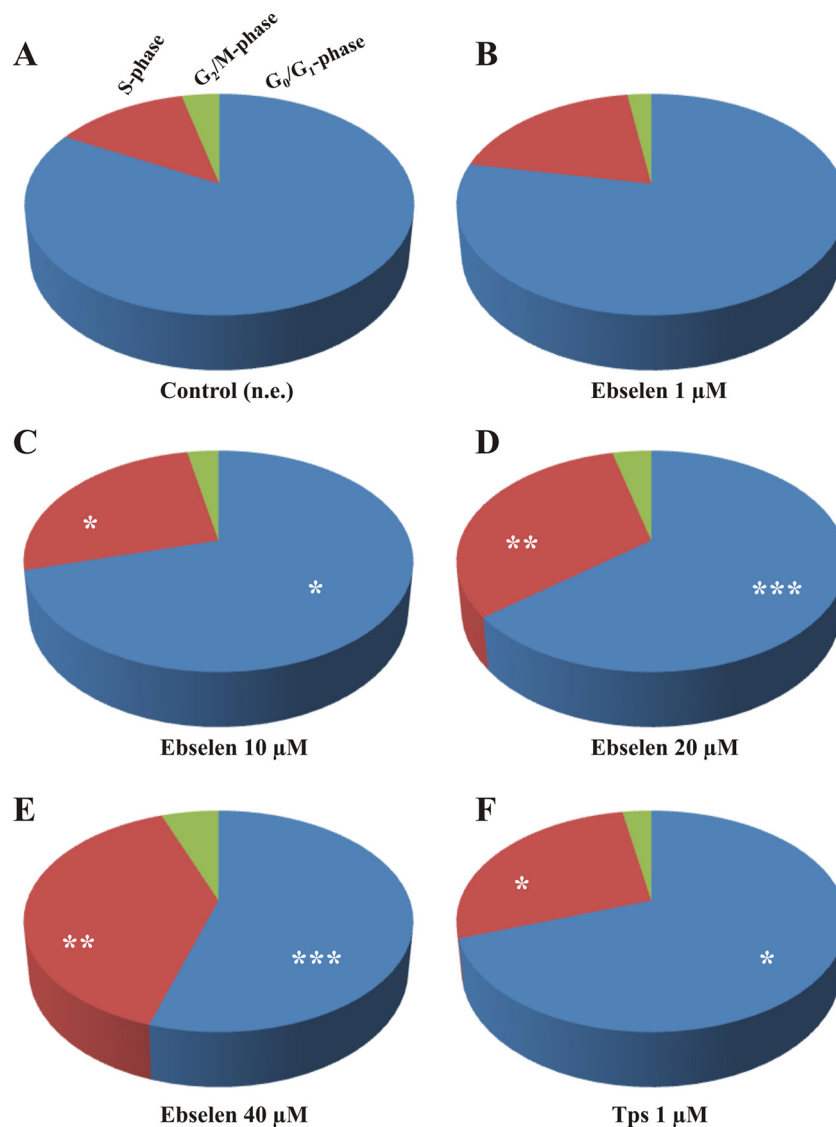


Fig. 2. Analysis of the cell cycle phase in response to ebselen. AR42J cells were incubated during 72 h in the absence of stimulus (A; control), or in the presence of 1 μ M (B), 10 μ M (C), 20 μ M (D) or 40 μ M (E) ebselen. Other group of cells was incubated in the presence of 1 μ M thapsigargin (F; Tps), a cell cycle inhibitor and cell death inducer. Progression of cells through the cell cycle was analyzed by flow cytometry, as described in "Section 2." Data are representative of five to seven independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs control cells).

to further induce a Ca^{2+} mobilization after stimulation of cells with ebselen, the results indicate that ebselen induces Ca^{2+} release from the same intracellular store as CCK-8 and Tps do, i.e., Ca^{2+} mobilization by ebselen involves the ER.

3.4. Effect of ebselen on mitochondrial activity

To study the effect of ebselen on mitochondrial physiology we employed different fluorescent dyes that selectively accumulate into mitochondria. Therefore, the probes employed report changes in physiological parameters within these organelles. We employed MitoTracker™ Green FM (100 nM) to analyze mitochondria network distribution, rhod-2 (8 μ M) to follow changes in $[\text{Ca}^{2+}]_m$ and TMRM (50 nM) to detect changes in mitochondria membrane potential (Ψ_m). Localization studies of mitochondria within AR42J cells reported similar results to those observed previously (Gonzalez et al., 2011). In MitoTracker™ Green FM-loaded cells a punctuated pattern staining could be noticed, which was mainly located at the periphery of the cells, beneath the plasma membrane. The center of the cells was not stained with the

dye (Fig. 7A). This means that this area is free of mitochondria and might be occupied mainly by the nucleus and other organelles. Distribution of fluorescence from rhod-2 and TMRM was similar to that observed with MitoTracker™ Green FM. Fig. 7B shows mitochondrial staining with TMRM. Following 10 min incubation of cells in the presence of 40 μ M ebselen, a disruption of the mitochondrial network could be noticed (Fig. 7A' and B'). Fig. 7C and C' shows the merged images of green and red fluorescence shown in A–A' and B–B'. Fig. 7D and D' shows a transmitted light image of the cells. Because disruption of mitochondria network could be the basis of a mitochondrial stress that could interfere with its functional network, we were also interested in evaluating the effect of ebselen on $[\text{Ca}^{2+}]_m$ and Ψ_m .

Mitochondria are organelles with a high ability to sequester Ca^{2+} (Gonzalez et al., 2000). Ca^{2+} released from the ER by ebselen could accumulate into mitochondria. As expected, when rhod-2-loaded cells were stimulated with 40 μ M ebselen, a transient increase in fluorescence could be observed, related to an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Thereafter, $[\text{Ca}^{2+}]_m$ returned towards a value over the prestimulation level (Fig. 8A; $n = 4$ exp/22 cell/71 mitochondrial areas). In

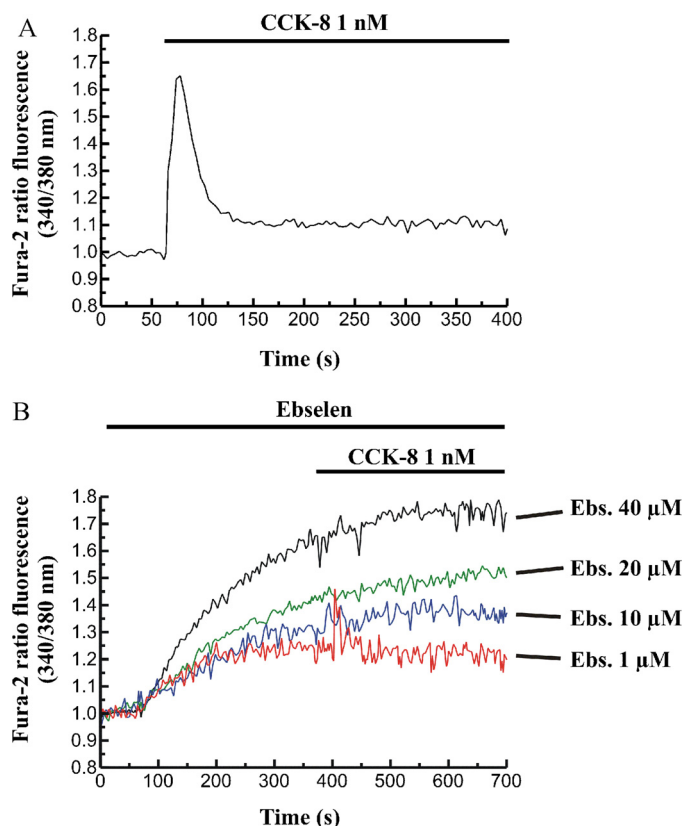


Fig. 3. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ in response to cholecystokinin (CCK-8) and ebselen. (A) Time-course of changes in $[Ca^{2+}]_c$ in fura-2-loaded AR42J cells stimulated with 1 nM CCK-8. (B) Cells were stimulated with ebselen (1 μ M–40 μ M). In the presence of ebselen, the cells were stimulated with 1 nM CCK-8. The experiments were carried out in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium. The horizontal bars indicate the time during which the stimuli were applied to the cells. The traces show the typical response of 4–5 such experiments.

the presence of ebselen, mitochondria failed to retain Ca^{2+} despite $[Ca^{2+}]_c$ remained elevated (see results for $[Ca^{2+}]_c$ above).

The function of mitochondria depends on the maintenance of Ψ_m . It could be possible that ebselen had also an effect on Ψ_m . Therefore, we performed a series of experiments in which AR42J cells, loaded with the mitochondria-specific voltage-sensitive dye TMRM, were stimulated with 40 μ M ebselen. As expected, when AR42J cells were stimulated with the compound a depolarization of Ψ_m could be detected (Fig. 8B; $n=4$ exp/24 cell/97 mitochondrial areas). Under our experimental conditions, upon removal of ebselen from the extracellular medium, no recovery of Ψ_m was observed (data not shown). In some experiments, after ebselen treatment the cells were additionally incubated in the presence of the mitochondrial uncoupler FCCP (100 nM). The protonophore failed to further depolarize mitochondria (Fig. 8B). These results suggest that ebselen disrupts the network distribution of mitochondria and impairs their physiology, thereby jeopardizing cellular fate.

3.5. Caspase-3 activity assay

The effects of ebselen that we have observed could be related to the process of apoptosis. Therefore, we examined the effect of the compound on caspase-3 activation. AR42J cells were incubated during 1 h in the presence of ebselen (1 μ M–40 μ M). Treatment of AR42J cells with ebselen induced a concentration-dependent increase in caspase-3 activation. As a control test, cells were incubated with 100 μ M H_2O_2 , a compound that promotes

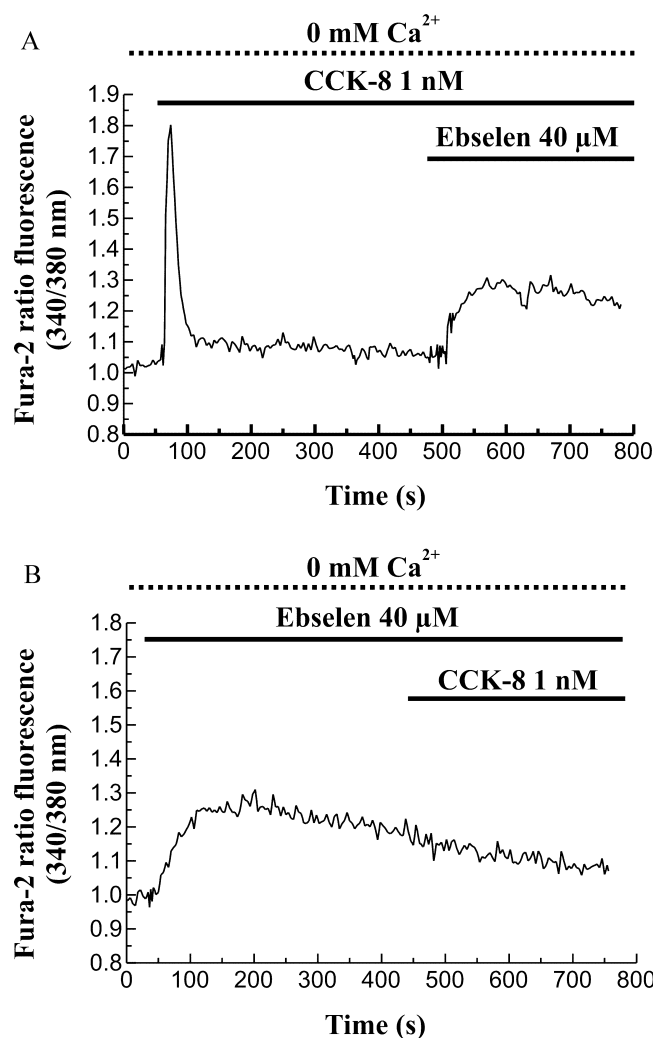


Fig. 4. Effect of agonist-induced Ca^{2+} stores depletion on ebselen-evoked Ca^{2+} responses. (A) Time-course of changes in $[Ca^{2+}]_c$ in response to CCK-8 (1 nM) and subsequent addition of ebselen (40 μ M). (B) Changes in $[Ca^{2+}]_c$ in response to 40 μ M ebselen and subsequent addition of CCK-8 (1 nM). All tests were performed in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing 500 μ M EGTA). Horizontal bars show the time during which the stimuli and Ca^{2+} free medium were applied to the cells.

apoptosis (Kaufmann et al., 2003). Treatment of cells with H_2O_2 significantly increased the caspase-3 activity (Fig. 9).

4. Discussion

In spite of the great number of investigations carried out to demonstrate the beneficial actions of ebselen against established pathological events, all related to potentially noxious situations involving oxidative stress, the hypothesis that ebselen might exert side effects leading to cell damage requires deep attention. Here we show that ebselen, at concentrations employed in former and actual research depicts an effect that is contrary to its expected protective action on cellular physiology.

Our results suggest that a major effect of ebselen involved Ca^{2+} mobilization from the ER. It has been reported that thiol-oxidation of ryanodine receptors underlies aberrant Ca^{2+} handling in cardiomyocytes, and leads to Ca^{2+} leak from the ER (Cooper et al., 2013). Additionally, oxidative modification of SERCA at cysteine residues contributes to decreased SERCA activity, resulting in impairment of Ca^{2+} uptake by the pump (Qin et al., 2013). The reactivity of ebselen with protein thiols has called attention of

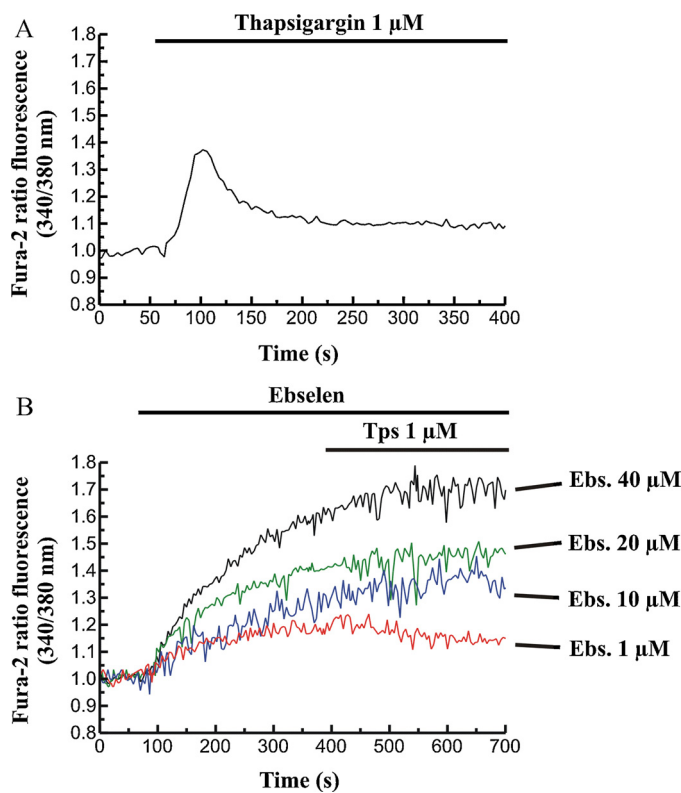


Fig. 5. Effect of ebselen on thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores. (A) Time-course of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in fura-2-loaded AR42J cells stimulated with $1 \mu\text{M}$ Tps. (B) AR42J cells were stimulated with ebselen ($1 \mu\text{M}$ – $40 \mu\text{M}$). In the presence of ebselen, the cells were challenged with $1 \mu\text{M}$ Tps. The experiments were carried out in the presence of Ca^{2+} in the extracellular medium. The horizontal bars show the time during which the stimuli were applied to the cells. The traces show the typical response of 4–5 such experiments.

researchers (Parnham and Sies, 2013). In fact, ebselen possibly utilizes available thiols on sulphhydryl proteins to effect its glutathione peroxidase (GPx) mimic action (Kade et al., 2013; Sies, 1993). Many cellular proteins contain cysteine residues, are central to cellular homeostasis, and are sensitive to red-ox status. Thus, agents that block protein surface thiols can disrupt the activity of enzymes and transporters, by means of changing their red-ox status (Antony and Bayse, 2011). Oxidation of crucial thiols within SERCA would explain the release of Ca^{2+} from agonist- and Tps-sensitive stores, and the resulting cytosolic Ca^{2+} overload that we have observed in the presence of ebselen.

Ca^{2+} released from the ER accumulates into mitochondria, and leads to changes in the physiology of the organelles (Gonzalez et al., 2003). Impairment of Ca^{2+} handling by mitochondria alters mitochondrial physiology (Dorn, 2013). In relation to this, disruption by ebselen of crucial events underlying mitochondrial homeostasis was shown in our study. Moreover, a disruption of mitochondrial network was noticed.

It is well known that mitochondrial dysfunction plays a pivotal role in the cell death decision. A recent work has shown that ebselen altered the mitochondrial respiration by inhibiting the activity of the mitochondrial complexes I and II (Puntel et al., 2013). The mechanism of action is mediated by its thiol oxidation activity. Inhibition of electron transport chain will result in depolarization of mitochondria, as we have shown. Furthermore, mitochondrial depolarization and fragmentation have been related to the loss of cell viability (Quintanilla et al., 2013).

A relationship between mitochondrial depolarization and apoptosis has also been demonstrated (Dorn, 2013). Activation of apoptosis pathway following treatment of cells with ebselen was

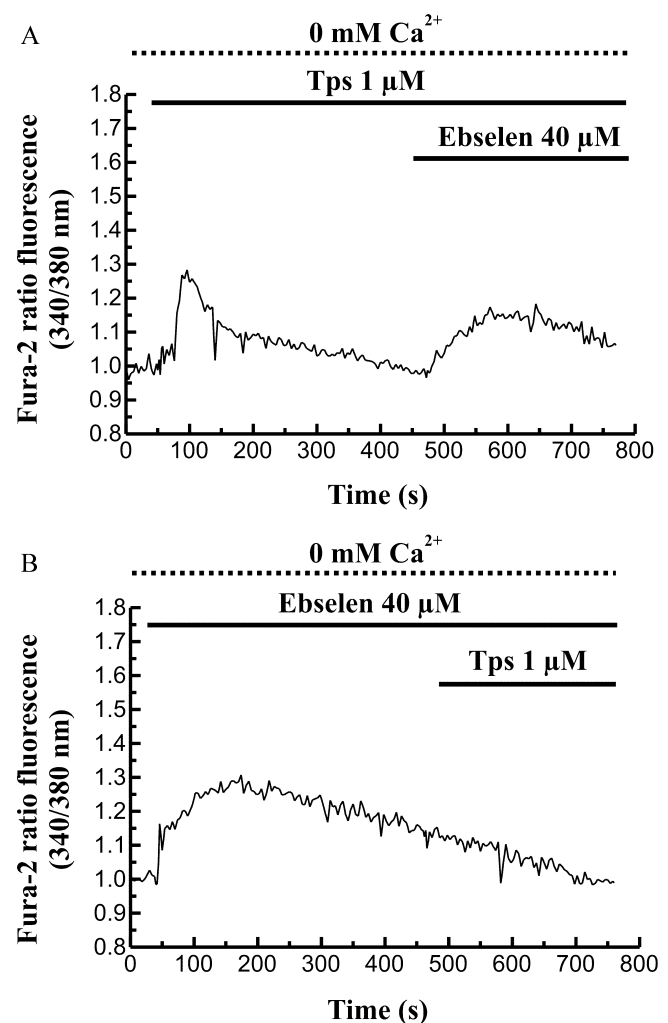


Fig. 6. Effect of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores depletion on ebselen-evoked Ca^{2+} responses. (A) Time-course of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evoked by Tps ($1 \mu\text{M}$) and subsequent addition of $40 \mu\text{M}$ ebselen. (B) Effect of ebselen ($40 \mu\text{M}$) on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and subsequent perfusion of cells with $1 \mu\text{M}$ Tps. All tests were performed in the absence of extracellular Ca^{2+} (medium containing $500 \mu\text{M}$ EGTA). The horizontal bars show the time during which the stimuli and Ca^{2+} free medium were applied to the cells. The traces show the typical response of 3–4 such experiments.

observed in our study. Thus, mitochondrial dysfunction could be considered an important factor in the toxicity of ebselen.

Finally, our results show that in the presence of ebselen the cell cycle was impaired. We noticed an increase in the number of cells remaining at the S-phase, whereas the fraction of cells in the G_0G_1 -phase was reduced. It might be also possible that the cells in the G_0G_1 -phase were more susceptible to detrimental effects of ebselen. This could be a feasible explanation for the reduced fraction of cells in the G_0G_1 -phase that we have observed in the presence of ebselen, without exerting any cell cycle arrest. In any case, our observations are consistent with an inhibition, or at least a slow down, of cellular proliferation that we have observed.

Our results support previous findings that show that concentrations of 20, 50, and $100 \mu\text{M}$ ebselen induce cell death (Yang et al., 2000; Brown et al., 2009; Salazar et al., 2008); however, the mechanisms remained unclear. More recently, it has been suggested that novel benzoisoselenazolone compounds derived from ebselen possess anti-invasive and anti-metastatic activity (Bijian et al., 2012). Additionally, inhibition by ebselen of α -methylacyl coenzyme A racemase, a metabolic enzyme whose overexpression has been shown in prostatic adenocarcinoma and

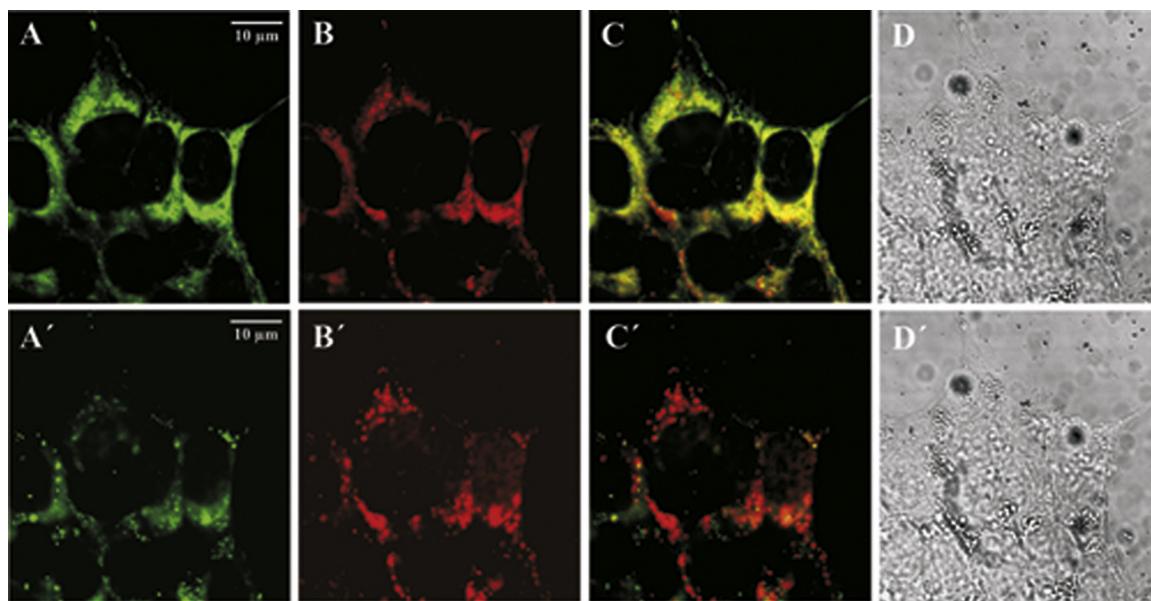


Fig. 7. Confocal microscopy study of AR42J cells loaded with fluorescent mitochondrial selective probes. Cells were co-loaded with the mitochondrial selective probes MitoTracker™ Green FM (100 nM) (A and A') and TMRM (50 nM) (B and B'). C and C' show a superimposed image with the MitoTracker™ Green FM fluorescence and the TMRM fluorescence signal. D and D' show the transmitted light images of cells for each series. Employing confocal laser scanning microscopy, bright fluorescent spots could be detected, being spread all through the cytosolic area. A dark round area, consistent with the nuclear localization, could be noticed. In non-stimulated cells (A–C) a consistent network of organelles could be observed. After incubation of cells in the presence of 40 μM ebselen (A'–C') a disruption of the mitochondrial network organization was noticed. The images are representative of 3 independent experiments.

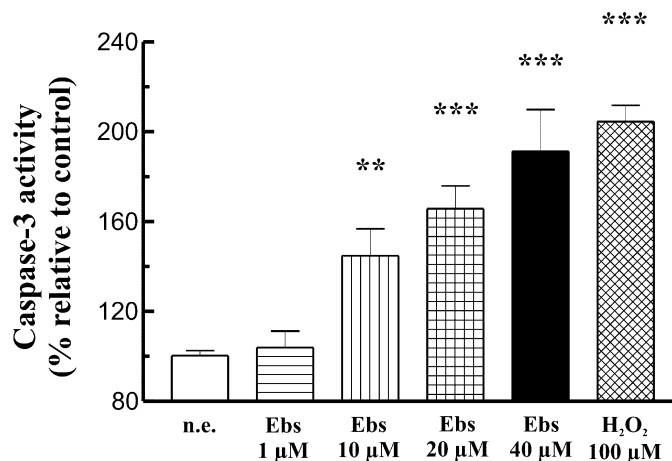
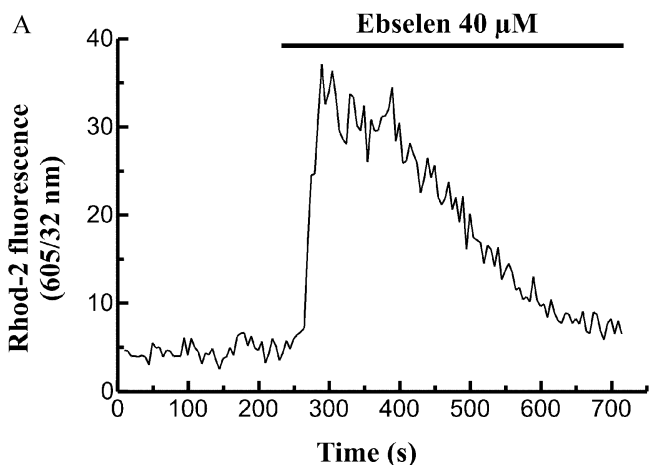
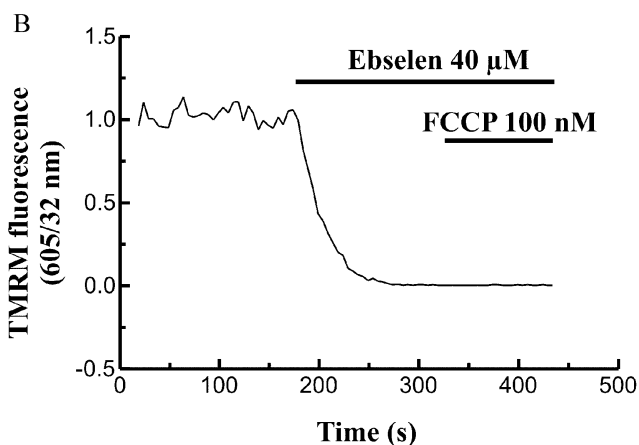


Fig. 9. Effect of ebselen on caspase-3 activity. AR42J cells were stimulated for 1 h with 1 μM–40 μM ebselen. In a control set of experiments, cells were incubated in the presence of 100 μM H₂O₂. Caspase-3 activity was estimated as described under “Section 2” (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, compared to non-stimulated cells –open column).



other solid tumors, has been suggested (Wilson et al., 2011). Finally, impairment of cellular red-ox status has been shown in myeloma cell lines, in which ebselen induced cell viability decrease and apoptosis (Zhang et al., 2014).

Fig. 8. Effect of ebselen on mitochondrial parameters in AR42J cells. (A) Time-course of changes in $[Ca^{2+}]_m$ in response to 40 μM ebselen. (B) Time-course of changes in Ψ_m in response to 40 μM ebselen. Cells were additionally perfused with the mitochondrial uncoupler FCCP (100 nM). Horizontal bars show the time during which the stimuli were applied to the cells. The graphs are representative of 4 independent experiments for each series.

5. Conclusion

Our results show that ebselen exerts deleterious actions on pancreatic tumor AR42J cells, which involve the regulation of crucial components implicated in the cellular processes of proliferation and apoptosis. The effects that we have observed may depend on the concentration of ebselen employed. Therefore, ebselen might depict a potential toxic effect in tumor cells. However, it is important to note that ebselen could also compromise the function of non-tumor cells, in such a way that it might lead to detrimental consequences in healthy cells.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

This work was supported by Junta de Extremadura-FEDER (GR10010). Patricia Santofimia-Castaño was granted a fellowship from Gobierno de Extremadura (PD10058; Consejería de Empleo, Empresa e Innovación) and European Social Fund. The authors would like to thank Mrs. Mercedes Gomez Blazquez and Juan J. Gordillo for their excellent technical support.

References

- Antony, S., Bayse, C.A., 2011. Modeling the mechanism of the glutathione peroxidase mimic ebselen. *Inorg. Chem.* 50, 12075–12084.
- Bijian, K., Zhang, Z., Xu, B., Jie, S., Chen, B., Wan, S., Wu, J., Jiang, T., Alaoui-Jamali, M. A., 2012. Synthesis and biological activity of novel organoselenium derivatives targeting multiple kinases and capable of inhibiting cancer progression to metastases. *Eur. J. Med. Chem.* 48, 143–152.
- Brown, R.D., Burke, G.A., Brown, G.C., 2009. Dependence of leukemic cell proliferation and survival on H₂O₂ and Larginine. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1211–1220.
- Cai, D.T., Jin, H., Xiong, Q.X., Liu, W.G., Gao, Z.G., Gu, G.X., Qiu, Y.H., 2013. ER stress and ASK1-JNK activation contribute to oridonin-induced apoptosis and growth inhibition in cultured human hepatoblastoma HuH-6 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 379, 161–169.
- Clemens, D.L., Calisto, L.E., Sorrell, M.F., Tuma, D.J., 2003. Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology* 38, 385–393.
- Connolly, M.J., Prieto-Lloret, J., Becker, S., Ward, J.P., Aaronson, P.I., 2013. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the absence of pretone: essential role for intracellular Ca²⁺ release. *J. Physiol.* 591 (Pt 18), 4473–4498.
- Cooper, L.L., Li, W., Lu, Y., Centracchio, J., Terentyeva, R., Koren, G., Terentyev, D., 2013. Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca²⁺ handling in ageing rabbit hearts. *J. Physiol.* 591 (Pt 23), 5895–5911.
- Dalla Corte, C.L., Bastos, L.L., Dobrachinski, F., Rocha, J.B., Soares, F.A., 2012. The combination of organoselenium compounds and guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains. *Brain Res.* 1430, 101–111.
- Dallwig, R., Deitmer, J.W., 2002. Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J. Neurosci. Methods* 116, 77–87.
- de Bem, A.F., Fiuza, B., Calcerrada, P., Brito, P.M., Peluffo, G., Dinis, T.C., Trujillo, M., Rocha, J.B., Radi, R., Almeida, L.M., 2013. Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen. *Nitric Oxide* 31, 20–30.
- del Castillo-Vaquero, A., Salido, G.M., Gonzalez, A., 2010. Melatonin induces calcium release from CCK-8- and thapsigargin-sensitive cytosolic stores in pancreatic AR42J cells. *J. Pineal Res.* 49, 256–263.
- Dorn 2nd, G.W., 2013. Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicol. Pathol.* 41, 227–234.
- Eum, W.S., Li, M.Z., Sin, G.S., Choi, S.Y., Park, J.B., Lee, J.Y., Kwon, H.Y., 2003. Dexamethasone-induced differentiation of pancreatic AR42J cell involves p21 (waf1/cip1) and MAP kinase pathway. *Exp. Mol. Med.* 35, 379–384.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y., 2005. Kinetic studies of the radical-scavenging activity of ebselen, a seleno-organic compound. *Anticancer Res.* 25, 3989–3994.
- Gonzalez, A., del Castillo-Vaquero, A., Miro-Moran, A., Tapia, J.A., Salido, G.M., 2011. Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J. Pineal Res.* 50, 250–260.
- Gonzalez, A., Granados, M.P., Salido, G.M., Pariente, J.A., 2003. Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal.* 15, 1039–1048.
- Gonzalez, A., Schmid, A., Sternfeld, L., Krause, E., Salido, G.M., Schulz, I., 1999. Cholecystokinin-evoked Ca²⁺ waves in isolated mouse pancreatic acinar cells are modulated by activation of cytosolic phospholipase A₂, phospholipase D, and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 726–733.
- Gonzalez, A., Schulz, I., Schmid, A., 2000. Agonist-evoked mitochondrial Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 275, 38680–38686.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Kade, I.J., Balogun, B.D., Rocha, J.B., 2013. In vitro glutathione peroxidase mimicry of ebselen is linked to its oxidation of critical thiols on key cerebral suphydryl proteins – a novel component of its Gpx-mimic antioxidant mechanism emerging from its thiol-modulated toxicology and pharmacology. *Chem. Biol. Interact.* 206, 27–36.
- Kaufmann, J.A., Perez, M., Zhang, W., Bickford, P.C., Holmes, D.B., Tagliatalata, G., 2003. Free radical-dependent nuclear localization of Bcl-2 in the central nervous system of aged rats is not associated with Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J. Neurochem.* 87, 981–994.
- Mahadevan, J., Parazzoli, S., Oseid, E., Hertz, A.V., Bernlohr, D.A., Vallerie, S.N., Liu, C.Q., Lopez, M., Harmon, J.S., Robertson, R.P., 2013. Ebselen treatment prevents islet apoptosis, maintains intranuclear Pdx-1 and MafA levels, and preserves β-cell mass and function in ZDF rats. *Diabetes* 62, 3582–3588.
- Marthandan, S., Hyland, P., Pawelec, G., Barnett, Y., 2013. An investigation of the effects of the antioxidants, ebselen or N-acetyl cysteine on human peripheral blood mononuclear cells and T cells. *Immun. Ageing* 10, 7.
- Nath, R., Raser, K.J., Hajimohammadreza, I., Wang, K.K., 1997. Thapsigargin induces apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells and cerebrotical cultures. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 197–205.
- Nielsen, S.F., Thastrup, O., Pedersen, R., Olsen, C.E., Christensen, S.B., 1995. Structure-activity relationships of analogues of thapsigargin modified at O-11 and O-12. *J. Med. Chem.* 38, 272–276.
- Parnham, M.J., Sies, H., 2013. The early research and development of ebselen. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1248–1253.
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., Rocha, J.B., 2013. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol. In Vitro* 27, 59–70.
- Qin, F., Siwik, D.A., Lancel, S., Zhang, J., Kuster, G.M., Luptak, I., Wang, L., Tong, X., Kang, Y.J., Cohen, R.A., Colucci, W.S., 2013. Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e000184.
- Quintanilla, R.A., Jin, Y.N., von Bernhardt, R., Johnson, G.V., 2013. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Mol. Neurodegener.* 8, 45.
- Rivera-Barreno, R., del Castillo-Vaquero, A., Salido, G.M., Gonzalez, A., 2010. Effect of cinnamtannin B-1 on cholecystokinin-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 980–988.
- Salazar, M., Pariente, J.A., Salido, G.M., Gonzalez, A., 2008. Ebselen increases cytosolic free Ca²⁺ concentration, stimulates glutamate release and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Toxicology* 244, 280–291.
- Santofimia-Castaño, P., Salido, G.M., González, A., 2013. Ebselen alters mitochondrial physiology and reduces viability of rat hippocampal astrocytes. *DNA Cell Biol.* 32, 147–155.
- Seamer, L.C., Babcock, G.F., Duque, R., 1993. Measurement of DNA. In: Robinson, J.P. (Ed.), *Handbook of Flow Cytometry Methods*. Wiley-Liss, New York, pp. 90–126.
- Sies, H., 1993. Ebselen a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 313–323.
- Stewart, M.S., Spallholz, J.E., Neldner, K.H., Pence, B.C., 1999. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 42–48.
- Wei, L., Zhang, Y., Yang, C., Wang, Q., Zhuang, Z., Sun, Z., 2014. Neuroprotective effects of ebselen in traumatic brain injury model: involvement of nitric oxide and p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41, 134–138.
- Wilson, B.A., Wang, H., Nacev, B.A., Mease, R.C., Liu, J.O., Pomper, M.G., Isaacs, W.B., 2011. High-throughput screen identifies novel inhibitors of cancer biomarker α-methylacyl coenzyme A racemase (AMACR/P504S). *Mol. Cancer Ther.* 10, 825–838.
- Yang, C.F., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Ebselen induces apoptosis in HepG2 cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 142–152.
- Zhang, L., Zhou, L., Du, J., Li, M., Qian, C., Cheng, Y., Peng, Y., Xie, J., Wang, D., 2014. Induction of apoptosis in human multiple myeloma cell lines by ebselen via enhancing the endogenous reactive oxygen species production. *Biomed. Res. Int.* 2014, 696107.

6 Discusión

Discusión

Las investigaciones que se vienen desarrollando en los últimos años en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, están dirigidas al estudio del estrés oxidativo y del papel protector que tienen diversos antioxidantes sobre la fisiología celular, utilizando como modelos el páncreas exocrino y el hipocampo. Son cuatro los antioxidantes que se han utilizado en los estudios: la cinamtanina B-1, el resveratrol, la melatonina y el ebselén. Los tres primeros se pueden encontrar en la naturaleza, en plantas y animales (en estos últimos solo melatonina), mientras que el cuarto antioxidante es un compuesto sintético. Dado que los estudios con cinamtanina B-1 y resveratrol ya estaban bastante avanzados, y se estaban completando en el momento en que se empezó a desarrollar esta Tesis Doctoral, hemos preferido incluir en la misma los resultados obtenidos en las investigaciones con los otros dos antioxidantes, la melatonina y el ebselen.

La melatonina está siendo muy utilizada en el momento actual en estudios científicos, así como suplemento nutraceútico por la población. Los estudios que se muestran en la presente Tesis han tratado de investigar el efecto que esta molécula pueda tener sobre la fisiología pancreática exocrina. Estas investigaciones, realizadas en células sanas, complementan los realizados anteriormente sobre un modelo de tumor de páncreas. El interés de esta parte de la investigación se basaba en los resultados publicados hasta la fecha por nuestro grupo, que indicaban que la melatonina inducía la muerte en células tumorales pancreáticas. Este indol estimula la movilización de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, y reduce la viabilidad celular alterando la actividad mitocondrial y mediante la activación de caspasa-3 (del Castillo-Vaquero y cols., 2010; Gonzalez y cols., 2011). Dadas estas observaciones tan interesantes, que se correspondían con las observadas por otros investigadores en otros tipos celulares, nos planteamos estudiar las acciones de la melatonina en células sanas, ya que hasta entonces no se disponían de resultados en esta línea. Es decir, era de interés averiguar qué efecto tenía la melatonina en células pancreáticas no tumorales.

El papel principal del páncreas exocrino es la secreción enzimas de digestivos. En este sentido, la secreción de amilasa se consigue a expensas de un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Williams 2006). Los primeros resultados que hemos obtenido muestran que la melatonina reduce la liberación de amilasa por las células acinares pancreáticas cuando

son estimuladas con la hormona gastrointestinal colecistocinina. Hemos empleado el fragmento 26-33 de la molécula, el octapéptido CCK-8, que contiene el centro activo de la hormona. Fueron cuatro las concentraciones de melatonina utilizadas, 1 μM , 10 μM , 100 μM y 1 mM. La secreción de amilasa estimulada por CCK-8 se redujo en presencia de cualquiera de las concentraciones de melatonina, sin afectarse el comportamiento bifásico de la secreción estimulada por el secretagogo. Esto quiere decir que la sensibilidad del páncreas a la hormona no se ve disminuida en presencia de la melatonina, y que son otros mecanismos los que subyacen las acciones del antioxidante. El efecto de la melatonina parece depender de la concentración utilizada, aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con 100 μM y 1 mM de melatonina.

El efecto que hemos observado parece estar relacionado con una menor movilización total de Ca^{2+} en respuesta a la CCK-8 en presencia de melatonina. Tras el análisis de los resultados, concluimos que la melatonina podría reducir la cantidad de Ca^{2+} liberada desde los depósitos intracelulares, estimular la actividad de los mecanismos encargados de la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o ambos, pero sin reducir la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Dado el protocolo experimental utilizado, podemos asegurar que la melatonina ejerce una acción reguladora directa sobre la fisiología del páncreas exocrino, ya que los estudios se realizaron en células asiladas.

La señalización mediada por el Ca^{2+} intracelular juega un papel importante en el acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino. El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiene unas características temporales y espaciales particulares, que son el resultado de una regulación rigurosa de la homeostasis del ion. Fundamentalmente, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementa en respuesta a los secretagogos debido a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos citoplasmáticos, así como por la activación de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular (Williams 2010; Yule 2010).

En el trabajo que nos ocupa hemos utilizado la concentración de 1 mM de melatonina, que es una concentración que se venía utilizando en los estudios inmediatamente anteriores realizados por el grupo de investigación. Hemos observado que, en presencia de melatonina, la movilización total de Ca^{2+} en respuesta a CCK-8 a concentraciones suprafisiológicas (1 nM) se reduce. La disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría

Discusión

explicarse por una menor liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, por una disminución de la entrada desde el espacio extracelular, y/o ser la consecuencia de un transporte más eficiente de Ca^{2+} fuera del citosol. El análisis de los resultados mostró que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular no se veía afectada en presencia de melatonina. Así, el efecto de la melatonina sobre la movilización total de Ca^{2+} en respuesta a CCK-8 se podía explicar en base a una modulación de los otros dos procesos. La primera aportación a estas investigaciones indica que los resultados se pueden explicar, en parte, por una reducción de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. En este sentido, experimentos adicionales apoyaron la observación anterior. En ellos observamos que el efecto de la melatonina sobre la movilización Ca^{2+} era más evidente cuando las células pancreáticas se estimulaban con concentraciones fisiológicas de CCK-8 (es decir, en el rango picomolar). A estas concentraciones la CCK-8 inducía un típico patrón oscilatorio en $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que era bloqueado en presencia de melatonina. Es decir, en presencia de melatonina no se observaba movilización de Ca^{2+} en respuesta a CCK-8. De modo interesante, la melatonina también redujo la movilización de Ca^{2+} en respuesta a la concentración suprafisiológica de CCK-8 empleada.

Está ampliamente aceptado que señales de Ca^{2+} fuera de control, y la posterior acumulación del ion en el citosol, pueden representar la base para el inicio de procesos inflamatorios en la glándula (Gonzalez y cols., 2011). En esta línea, la sobrestimulación con CCK-8 conduce a un aumento sostenido y anómalo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La acumulación mantenida del ion en el citosol conduce a la activación de las enzimas digestivas dentro de la glándula, proceso que se ha relacionado con la aparición de pancreatitis (Fakhari y cols., 2014). Una concentración tan elevada de este secretagogo no se alcanza en condiciones fisiológicas; sin embargo, se podría alcanzar bajo condiciones patológicas, lo que podría conducir a la sobreestimulación de la glándula y una consecuente pancreatitis. Las concentraciones de CCK-8 en el rango nanomolar y milimolar se emplean generalmente para simular una estimulación fisiopatológica de la glándula, con el objeto de inducir pancreatitis (Saluja y cols., 2007; Osborne y cols., 2014; Weber y cols., 2009). Por lo tanto, cualquier mecanismo fisiológico dirigido a reducir la acumulación de Ca^{2+} en el citosol podría contrarrestar un posible trastorno del

páncreas. Los resultados que hemos observado en presencia de melatonina reflejan su papel como protector de la glándula (Jaworek y cols., 2003; Jaworek y cols., 2007; Jaworek y cols., 2010b).

Dado que la movilización de Ca^{2+} inducida por CCK-8 fue menor en presencia de la melatonina, cabía esperar una menor liberación de amilasa, como muestran los resultados que hemos obtenido. Anteriormente se ha observado en el Departamento de Fisiología de la UEx que la secreción pancreática exocrina es modulada por los antioxidantes; por ejemplo, la cinamtanina B-1, un polifenol aislado del laurel, modula la secreción de amilasa en respuesta a CCK-8, efectos que podrían estar relacionados con una modulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gonzalez y cols., 2012; Rivera-Barreno y cols., 2010).

El aumento prolongado de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a concentraciones suprafisiológicas de CCK-8 se ha relacionado con la generación de estrés oxidativo en el páncreas exocrino (Granados y cols., 2004). Ésta puede ser una condición que lleve a la alteración de la función celular y a la reducción de la viabilidad de las células acinares pancreáticas. Los resultados que hemos obtenido también muestran que la melatonina protege las células pancreáticas frente a los efectos perjudiciales de la incubación con H_2O_2 , condiciones que simulan un estrés oxidativo en la glándula, en las que se observó una reducción de la viabilidad celular. Sin embargo, y de modo muy interesante, la incubación de las células en presencia de melatonina sola no indujo cambios en la viabilidad celular, efecto contrario al que habíamos observado anteriormente en células tumorales pancreáticas. Por lo tanto, la melatonina parece proteger a las células acinares pancreáticas frente a situaciones que generan estrés oxidativo y frente a la sobreestimulación de la secreción de enzimas digestivas, condiciones que se han señalado como precursores de los procesos inflamatorios.

Nuestros resultados podrían en principio contradecir los publicados por otros investigadores, que han demostrado que la melatonina estimula la secreción de enzimas pancreáticas (Jaworek 2006; Jaworek y cols., 2010a). Pero estos estudios se realizaron *in vivo*. En el modelo descrito por el grupo de Jaworek, la administración intraduodenal de melatonina estimulaba la secreción de enzimas pancreáticas a través de la activación de los nervios abdominales, que conducía a la liberación de CCK desde el intestino. La melatonina podría activar un reflejo entero-pancreático que, mediante la liberación de

Discusión

CCK en el dudodeno, se estimularía la secreción pancreática (es decir, en el modelo de Jaworek, la melatonina ejerce sus efectos de forma indirecta).

Nuestros resultados también muestran que la melatonina no estimulaba la liberación de amilasa a ninguna de las concentraciones ensayadas. En este sentido, los resultados están de acuerdo con observaciones anteriores del grupo citado (Jaworek 2006; Jaworek y cols., 2010a; Jaworek y cols., 2004). En ellas se muestra que la melatonina o el L-triptófano no incrementan significativamente la secreción enzimática en acinos pancreáticos aislados.

Queremos añadir que los efectos *in vitro* de la melatonina no pueden ser directamente comparados con los observados en estudios *in vivo*. Mientras que *in vivo* hay numerosos mecanismos indirectos que intervienen en la regulación de la secreción de enzimas pancreáticas, los acinos pancreáticos aislados pueden ser un modelo útil para investigar los efectos directos de ciertas drogas. Además, no podemos excluir que la melatonina podría comportarse de forma diferente cuando actúa a concentraciones fisiológicas o farmacológicas.

Nuestros resultados apoyaban investigaciones recientes de Huai y cols. (Huai y cols., 2012), que sugerían que los efectos protectores de la melatonina parecían implicar un aumento en la expresión de dos importantes transportadores de Ca^{2+} : SERCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Esta posibilidad dirigiría las acciones de la melatonina hacia la estimulación de un transporte más eficiente del Ca^{2+} , con la consiguiente menor acumulación citoplasmática del ion. Esta aportación nos permitiría explicar la menor secreción de amilasa que hemos observado. Sin embargo, en ese trabajo no se estudió a fondo la regulación de la movilización de Ca^{2+} . Y esto fue por tanto el objetivo de nuestro siguiente estudio.

Para estudiar más a fondo el posible efecto de la melatonina sobre los mecanismos de homeostasis de Ca^{2+} , utilizamos la concentración de melatonina de 100 μM . La decisión la basamos en que previamente habíamos observado que no había diferencia significativa comparada con la concentración de 1 mM en su efecto sobre la secreción de amilasas.

Un aspecto muy interesante que observamos fue que la liberación inicial de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares inducida por dosis suprafiológicas de CCK-8 no se redujo en presencia de melatonina 100 μM . Es decir, analizando el pico alcanzado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación de las células con CCK-8 en ausencia o en presencia de melatonina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Por lo tanto, la disminución en la movilización total de Ca^{2+} observada en presencia de la melatonina 100 μM no podía explicarse por una menor liberación de Ca^{2+} inducida por CCK-8 en presencia de melatonina, ni tampoco la menor secreción de amilasa que habíamos observado.

Así, y teniendo en cuenta los resultados de Huai y cols. (2012), nos planteamos la hipótesis de que un mayor transporte de Ca^{2+} fuera del citosol podría explicar la menor $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alcanzada después de la estimulación de las células acinares pancreáticas con CCK-8 en presencia de melatonina. Los mecanismos de control de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se podían ver modulados en presencia de melatonina eran el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática hacia el medio extracelular (mediado por la PMCA), el transporte de Ca^{2+} hacia el retículo endoplasmático (mediado por la SERCA) y/o la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias.

Los resultados que obtuvimos confirmaron nuestra hipótesis. Cuando inhibíamos la SERCA incubando las células con Tps, observamos que en presencia de melatonina estaba estimulado el transporte de Ca^{2+} a través de la bomba PMCA, lo que conllevaba a una reducción de la acumulación Ca^{2+} después de la estimulación de las células con CCK-8. Por otro lado, cuando la PMCA fue inhibida mediante la incubación de las células acinares pancreáticas en presencia de La^{3+} , observamos que el transporte de Ca^{2+} hacia los depósitos intracelulares (RE y/o las mitocondrias) podría ser estimulado en presencia de melatonina, con la consiguiente reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la estimulación de las células con CCK-8.

La recaptación de Ca^{2+} por las mitocondrias juega un papel importante en la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en distintos tipos celulares, incluido el páncreas exocrino (Gonzalez y cols., 2000), y podría ser un mecanismo estimulado por la melatonina. Sin embargo, los resultados obtenidos cuando se desacoplaba este transporte en presencia de FCCP, sugieren que la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias no era estimulada por la

Discusión

melatonina. Hemos realizado además un estudio de los efectos de la melatonina sobre la actividad mitocondrial, analizando la $[Ca^{2+}]_m$ y el potencial de membrana mitocondrial, y debemos mencionar que no hemos observado cambios detectables en estos parámetros (resultados no publicados).

Por otra parte, el desacoplamiento de las mitocondrias por FCCP podría conducir a una menor disponibilidad de ATP que, a su vez, podría afectar el transporte Ca^{2+} a través de las bombas ATPasas (SERCA y PMCA). Esto podría disminuir su capacidad de transporte de Ca^{2+} . Una posible estimulación por la melatonina del intercambiador Na^+/Ca^{2+} podría entonces compensar dicho transporte de Ca^{2+} fuera del citosol. En este escenario, la estimulación del intercambiador de iones podría ser el mecanismo responsable de la reducción de la movilización total de Ca^{2+} inducida por CCK-8 o TPS cuando se desacopla la mitocondria. Estas observaciones apoyarían también los resultados descritos por Huai y cols. (2012) que hemos mencionado anteriormente; sin embargo, se ha sugerido previamente que la extrusión del ion por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas no es predominante, sino que tiene lugar preferentemente por la PMCA (Tepikin y cols., 1992). Otros autores también han sugerido que la inhibición del intercambiador Na^+/Ca^{2+} tiene poca influencia sobre la dinámica del Ca^{2+} en células beta-pancreáticas de rata (Hughes y cols., 2006). Por lo tanto, creemos que la melatonina podría estimular mayoritariamente el transporte de Ca^{2+} a través de la PMCA, hacia el medio extracelular, o hacia el interior del RE, mediante la SERCA.

El análisis más profundo de nuestros resultados, nos hace creer que la SERCA podría no desempeñar un papel fundamental en el transporte de Ca^{2+} estimulado por la melatonina en nuestro modelo celular. Obtenemos esta conclusión a partir de los resultados observados en los experimentos llevados a cabo en presencia de FCCP (para desacoplar las mitocondrias) más $LaCl_3$ (para inhibir la PMCA). En estas condiciones experimentales, SERCA no se inhibe (ya que no había TPS presente en el medio extracelular), y no observamos diferencias estadísticamente significativas en los registros inducidos por CCK-8 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia o en ausencia de melatonina.

Los efectos de la melatonina sobre las respuestas inducidas por CCK-8 apuntan nuevamente hacia un efecto protector de la melatonina sobre el páncreas exocrino,

modulando la señalización de Ca^{2+} y la secreción de amilasa inducida por CCK-8. Es probable que los cambios inducidos por CCK-8 en la señalización de Ca^{2+} en presencia de la melatonina (que no están relacionados con la disminución del *influx* de Ca^{2+} desde el medio extracelular) pudieran explicarse no solo por la reducción de liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, sino también por un transporte más eficiente de dicho ion a través de las membranas celulares, fundamentalmente por la bomba PMCA. En una hipotética situación patológica, en la que se produzca una acumulación excesiva de Ca^{2+} en el medio intracelular, la melatonina podría aliviar dicha sobrecarga citosólica en las células acinares pancreáticas. Esto repercutiría en una menor generación de ERO y en una menor posibilidad de activación intrapancreática de las enzimas digestivas, reduciéndose el peligro de inflamación de la glándula.

Debemos destacar que las concentraciones de melatonina que hemos utilizado en este estudio son superiores a las que se encuentran normalmente en sangre. En condiciones fisiológicas, la concentración plasmática de melatonina durante la noche alcanza 100-150 pg/mL, mientras que dichos valores en el transcurso del día rondan los 6-60 pg/mL; por lo que las concentraciones de melatonina usadas en los trabajos que componen esta Tesis son superiores a las que se han determinado en la sangre, y entrarían en el rango farmacológico. Sin embargo, *in vivo*, se han encontrado diferentes concentraciones de melatonina en distintos fluidos u orgánulos celulares. Por ejemplo, muchos tejidos sintetizan la melatonina para su uso local, donde presentará una acción autocrina o paracrina. Además, algunos fluidos, como por ejemplo bilis o líquido cefalorraquídeo, tienen concentraciones de melatonina que son varios órdenes de magnitud más altos que los determinados en la sangre. Por lo tanto, en general, se considera que los niveles sanguíneos de melatonina no pueden ser aquellos que definen cuáles son las concentraciones fisiológicas de este indol, ya que las concentraciones locales de melatonina aun no han sido definidas con exactitud.

En este momento habíamos finalizado las investigaciones que habíamos diseñado para averiguar el efecto que tenía la melatonina sobre la fisiología pancreática. Otra línea de investigación desarrollada por mi Director de trabajo, y que se incluyó en mi proyecto de Tesis Doctoral, está enfocada al estudio de la fisiología de los astrocitos de hipocampo. Para las siguientes investigaciones realizamos unos ensayos preliminares

Discusión

de viabilidad de astrocitos tratados con los cuatro antioxidantes que se venían utilizando en el laboratorio: cinamtanina B-1, resveratrol, melatonina y ebselen. De los cuatro compuestos, aquel que despertó nuestro interés, por su efecto sobre la viabilidad celular, fue el ebselen. Los demás no mostraron efectos detectables. En relación con este antioxidante, resultados publicados en el año 2008 mostraron que inducía un estado de reactividad astrocitaria, en el que se observaba un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, la secreción de glutamato y un aumento en la expresión de GFAP (Salazar y cols., 2008a). Con estos resultados preliminares de viabilidad celular, y teniendo en cuenta nuestras observaciones anteriores, nos planteamos la hipótesis de que el ebselen podría tener efectos perjudiciales, por lo que decidimos continuar investigando sobre sus efectos en la fisiología de los astrocitos de hipocampo.

En esta línea de investigación, multitud de investigadores han mostrado que el ebselén, un compuesto seleno-orgánico que se desarrolló originalmente como un agente anti-inflamatorio, protege contra el daño causado por los radicales libres en el SNC y otros tejidos. Muchas investigaciones muestran las acciones beneficiosas de esta sustancia contra patologías establecidas y situaciones potencialmente nocivas que involucran el estrés oxidativo (Funchal y cols., 2006; Green y Ashwood 2005; Niederau y cols., 1991; Perez-Ortiz y cols., 2004). Se han empleado concentraciones de ebselén que varían desde 1 a 40 μ M en diferentes tejidos y tipos celulares, en los que muestra una acción protectora (Du y cols., 2012; Hassan y cols., 2010; Yamagata y cols., 2008; Yue y cols., 2011).

Sin embargo, en distintos tipos celulares se han observado acciones perjudiciales inducidas por compuestos que contienen selenio, por lo que cobra importancia la hipótesis de que ebselén podría ejercer efectos que conllevan daño celular. En este sentido, los últimos datos epidemiológicos sugieren que la sobreexposición al selenio puede facilitar la aparición de enfermedades degenerativas crónicas (Estevez y cols., 2014). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los compuestos que contienen selenio, como el ebselen, podrían inducir dicho daño celular, no están del todo esclarecidos.

Los resultados que hemos obtenido sugieren que el ebselén, en el rango de concentraciones empleadas en investigaciones actuales, tiene un efecto contrario a la

acción protectora esperada sobre la fisiología celular. Nuestros resultados sugieren que un efecto importante del ebselén es promover la movilización de Ca^{2+} desde el RE. Se ha demostrado que los compuestos que contienen selenio son capaces de abrir canales de liberación de Ca^{2+} en la membrana del RE, lo que conduce a un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Xia y cols., 2004). El mecanismo de acción podría implicar a los grupos tioles presentes en la molécula de estas proteínas. Se ha documentado que la oxidación de grupos tioles de receptores de rianodina induce un incremento anormal del Ca^{2+} citosólico en cardiomiocitos, y que este Ca^{2+} proviene del RE (Cooper y cols., 2013). De acuerdo con estas observaciones, un trabajo previo del Departamento de Fisiología de la UEx sugiere que el ebselén induce la liberación de Ca^{2+} desde el RE en astrocitos de hipocampo (Salazar y cols., 2008a). En esta Tesis hemos confirmado estas observaciones.

La reactividad que posee el ebselén con los grupos tioles de superficie de determinadas proteínas celulares ha llamado la atención de los investigadores (Parnham y Sies 2013). Dicha reactividad puede ser la causa de la inhibición de distintas enzimas, así como de la actividad de transportadores, mediante el cambio de su estado red-ox (Antony y Bayse 2011). De hecho, el ebselén posiblemente utiliza tioles disponibles en proteínas sulfhidrilo para imitar la acción el efecto de la enzima GPx (Kade y cols., 2013; Sies 1993).

La modificación oxidativa de SERCA en los residuos de cisteína inducida por el ebselen podría contribuir a la disminución de la actividad de dicha bomba ATPasa, conduciendo al deterioro de la captación de Ca^{2+} mediante SERCA (Qin y cols., 2013) y, por tanto, a una sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, tal y como hemos observado en presencia de ebselén. Además, el vaciamiento del contenido de Ca^{2+} desde el RE se ha relacionado al estrés celular y con la alteración de la fisiología celular (Fradejas y cols., 2010; Kim y cols., 2010).

Es conocido que el Ca^{2+} liberado desde el RE se acumula en la mitocondria, y que conduce a cambios en la fisiología de estos orgánulos celulares (Gonzalez y cols., 2003). Sin embargo, la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} en la mitocondria, influye negativamente en su fisiología y puede causar la muerte celular (Dorn 2013). En relación con dichos procesos nuestros resultados muestran que el ebselén induce la pérdida de la homeostasis mitocondrial, reflejada en una alteración de su potencial de membrana y

Discusión

en su capacidad de acumular Ca^{2+} . Estas acciones se producirían sobre la base de que en la mitocondria existen proteínas que contienen residuos de cisteína, que cumplen funciones importantes para la fisiología mitocondrial, y que son sensibles al estado red-ox (Murphy 2012).

Un mecanismo fundamental en la citotoxicidad del selenio es un cambio en el estado oxidativo de los sistemas celulares (Wallenberg y cols., 2010). Las mitocondrias son orgánulos con una función importante en el metabolismo oxidativo celular, ya que en la matriz mitocondrial se producen muchos de los procesos centrales del metabolismo (Duchen 2004). Se ha demostrado que el selenio puede influir en la actividad y la función de las oxidorreductasas intracelulares (Wallenberg y cols., 2010). Estas proteínas llevan a cabo una función central en el mantenimiento del equilibrio red-ox en la célula, y su desequilibrio puede contribuir a la toxicidad de selenio. Un trabajo reciente ha demostrado que el ebselén altera la respiración mitocondrial mediante la inhibición de la actividad de los complejos mitocondriales I y II (Puntel y cols., 2013). Este mecanismo de acción podría estar mediado por la actividad oxidativa del ebselén sobre los grupos tioles. Como consecuencia de la inhibición, o de la reducción de la actividad, de la cadena respiratoria podría producirse una disminución o la pérdida total del potencial de membrana mitocondrial, como hemos observado en nuestro estudio.

Nuestros resultados también han mostrado que el esbelen induce una desorganización de la red mitocondrial. Las mitocondrias forman una red dinámica responsable de la producción de energía, la homeostasis de Ca^{2+} y la señalización celular. Una distribución adecuada de la red mitocondrial contribuye al correcto funcionamiento de dichos orgánulos y es esencial para la supervivencia celular (Frederick y Shaw 2007). Además, la redistribución de las mitocondrias en el interior de la célula es un factor clave de distintas vías de regulación (Murphy 2012). Se ha sugerido que la fragmentación de la red mitocondrial está relacionada con la neurodegeneración (Almajan y cols., 2012). También hemos observado que el ebselén induce un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Un proceso común asociado con el estrés oxidativo y el deterioro mitocondrial grave es el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, como se describe en muchas enfermedades neurodegenerativas (Eckmann y cols., 2013). Dado que la homeostasis mitocondrial juega un papel fundamental en la

función y supervivencia celular (Dorn 2013); (Quintanilla y cols., 2013), consideramos que el ebselen podría tener efectos perjudiciales para la supervivencia de los astrocitos, y que la disfunción mitocondrial puede ser considerada un factor importante en la toxicidad de ebselén. En este trabajo no detectamos activación de caspasas, por lo que la reducción de la viabilidad celular podría deberse a la pérdida de la capacidad mitocondrial para sostener la actividad celular.

Recientemente se ha sugerido que hay compuestos derivados del ebselen que poseen actividad antiinvasiva y antimetastásica (Bijian y cols., 2012). Por otra parte, se ha observado que el ebselén induce la inhibición de la α -metilacil-coenzima A racemasa, una enzima metabólica cuya sobreexpresión se ha detectado en el adenocarcinoma de próstata y otros tumores sólidos (Wilson y cols., 2011). Y también se ha observado un deterioro del estado redox celular, una disminución de la viabilidad celular y apoptosis en líneas celulares de mieloma (Zhang y cols., 2014).

Teniendo en cuenta que el ebselen y los compuestos estructuralmente relacionados podrían presentar acciones antitumorales, nos planteamos la hipótesis de que el ebselen podría ejercer dichos efectos en el modelo celular AR42J, el modelo celular que dio pie a las investigaciones sobre melatonina con las que se inició esta Tesis Doctoral. Vistos los efectos del ebselen sobre los astrocitos, era interesante analizar sus acciones sobre este modelo celular tumoral.

Como era de esperar, el ebselen redujo la viabilidad de las células tumorales pancreáticas. El ciclo celular se vio afectado por el ebselen. Observamos un incremento en el número de células que permanecían en la fase S, mientras que la fracción de células que se encontraba en la fase G0/G1 se reducía. Estos resultados nos hicieron pensar que las células en la fase G0/G1 podrían ser más susceptibles a los efectos perjudiciales del ebselén. También observamos que la actividad y la organización mitocondrial se veían alteradas en presencia del ebselen. Pero a diferencia de lo que habíamos observado en los astrocitos, en las células AR42J sí observamos activación de caspasa 3. Nuestras observaciones son pues consistentes con una inhibición, o al menos una desaceleración, de la proliferación celular, y apoyan hallazgos previos que muestran que determinadas concentraciones de ebselén inducen la muerte en células tumorales (Yang y cols., 2000a).

7 Conclusiones

Conclusiones

De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

❖ La melatonina no parece tener efectos negativos sobre la viabilidad celular, mientras que el ebselen la reduce en los modelos celulares en que se ha ensayado.

❖ La melatonina y el ebselen presentan, a las concentraciones estudiadas y en los tipos celulares utilizados, efectos contrarios sobre la homeostasis del ion Ca^{2+} . Mientras que la primera parece reducir su acumulación citosólica en respuesta a los agonistas, debido a una menor movilización desde los depósitos intracelulares y a un transporte más eficiente de los iones a través de membranas celulares, el segundo estimula su movilización desde los depósitos intracelulares, y conduce a una elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

❖ La melatonina, *per se*, no estimula la secreción de amilasa pancreática, pero reduce la secreción estimulada por el agonista pancreático CCK-8.

❖ No se han detectado cambios en los parámetros mitocondriales estudiados en las células acinares pancreáticas incubadas en presencia de melatonina. Por el contrario, el ebselen induce cambios importantes en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$, en el potencial de membrana y en la integridad de la red mitocondrial, que podrían comprometer su función.

❖ Descartados los efectos negativos de la melatonina sobre la viabilidad celular, el ebselén induce cambios interesantes sobre el ciclo celular, deteniendo la proliferación celular y promoviendo la muerte celular, hechos que se han estudiado en astrocitos de hipocampo y en células tumorales AR42J.

Conclusión general:

A la vista de los resultados descritos en esta Tesis Doctoral, y tratando de reunir en un juicio homogéneo las conclusiones que acabamos de mencionar, podríamos aventurarnos a concluir que los antioxidantes utilizados ejercerían acciones beneficiosas (protección) en células sanas, pero perjudiciales (muerte) en las células tumorales. Dos factores fundamentales en todas estas acciones, y que hay que tener muy en cuenta, son el tipo y la concentración de antioxidante utilizada. Si bien los resultados parecen estar más claros en el caso de la melatonina, no podemos concluir lo mismo sobre el ebselen. Por el momento, no sabemos dónde se encuentra la frontera entre el efecto protector del ebselen en las células sanas y el efecto proapoptótico en células tumorales, todo ello teniendo en cuenta las concentraciones empleadas en nuestros estudios.

Por ello, creemos que no es posible generalizar y asumir que los antioxidantes, cualesquiera, tienen efectos positivos sobre el organismo. Son necesarias más investigaciones que nos permitan establecer dónde se encuentra ese límite entre lo beneficioso y lo perjudicial de las acciones de los antioxidantes, antes de concluir qué antioxidantes y qué concentraciones podrían comprometer la función de las células tumorales, sin dar lugar a consecuencias perjudiciales en las células sanas, sobre las que ejercerían efectos protectores.

CONCLUSIONS

From the results presented in this Thesis, we have obtained the following conclusions:

❖ Melatonin does not exert deleterious effects on cell viability, whereas in the presence of ebselen a decrease in cell viability was observed in the cellular models in which it was tested.

❖ Melatonin and ebselen, at the concentrations evaluated and in the cellular models employed, depict opposite effects on Ca^{2+} homeostasis. Whereas the first one leads to a lower level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to agonists, probably due to a smaller Ca^{2+} release from intracellular stores and due to a more efficient transport of the ions across the cellular membranes, ebselen stimulates Ca^{2+} mobilization from the stores and induces its accumulation within the cytosol, leading to a sustained $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

❖ Melatonin, itself, does not stimulate amylase release by pancreatic acinar cells, but reduces amylase secretion evoked by the pancreatic agonist CCK-8.

❖ No detectable changes in the mitochondrial parameters studied were observed in pancreatic acinar cells incubated with melatonin. Conversely, in astrocytes and AR42J cells, ebselen led to major changes in $[\text{Ca}^{2+}]_m$, in mitochondrial membrane potential, in mitochondrial membrane permeability and on mitochondrial network integrity, which could compromise their function.

❖ Ruled out the negative effects of melatonin on cell viability, ebselen induces interesting changes on cell cycle, keeping down cellular proliferation and promoting cell death in hippocampal astrocytes. Ebselen induced similar effects in tumor AR42J cells.

General conclusion:

Taken together the results shown in the present PhD Thesis, and putting our findings together under a consistent idea, we could conclude that antioxidants might exert positive actions (protection) on healthy cells, but would exert deleterious actions (death) on tumor cells. There are two major factors underlying these effects that should be taken into account: the type and the concentration of antioxidant employed. Despite the effects of melatonin are clearer, we cannot conclude the same about ebselen. At the present moment, we do not know where is located the border that separates the protective and the negative effects of ebselen in a certain cell type.

Therefore, we think that it is not possible by the moment to assume that antioxidants, any type, have beneficial effects on the body. Further research will be needed in order to elucidate the mechanisms of actions of these compounds, which will let to establish the type of antioxidant and the exact doses at which a certain antioxidant would compromise tumor cells progression without injuring healthy cells, on which the compound will show protective effects.

Conclusiones

8 Bibliografía

Bibliografía

- Abbott N. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* **200**:527
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A y Khaldy H. 2003. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* **527**:549-57
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, Leon J, y cols.,. 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* **30**:65-74
- Acuña Castroviejo D, Lopez LC, Escames G, Lopez A, Garcia JA y Reiter RJ. 2011. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* **11**:221-40
- Ahmad A, Syed FA, Singh S y Hadi SM. 2005. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett* **159**:1-12
- Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC y Lauber JK. 1985. N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocul Pharmacol* **1**:149-60
- Aitken JB, Lay PA, Duong TT, Aran R, Witting PK, y cols.,. 2012. Synchrotron radiation induced X-ray emission studies of the antioxidant mechanism of the organoselenium drug ebselen. *J Biol Inorg Chem* **17**:589-98
- Akterin S, Cowburn RF, Miranda-Vizuete A, Jimenez A, Bogdanovic N, y cols.,. 2006. Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* **13**:1454-65
- Alberdi E, Sanchez-Gomez MV y Matute C. 2005. Calcium and glial cell death. *Cell Calcium* **38**:417-25
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M y Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89**:73-120
- Almajan ER, Richter R, Paeger L, Martinelli P, Barth E, y cols.,. 2012. AFG3L2 supports mitochondrial protein synthesis and Purkinje cell survival. *J Clin Invest* **122**:4048-58
- Alvarez J. 2012. Calcium dynamics in the secretory granules of neuroendocrine cells. *Cell Calcium* **51**:331-7
- Ames BN, Shigenaga MK y Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7915-22
- Amitai Y. 2010. Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. *Glia* **58**:1775-81
- Amorati R, Valgimigli L, Diner P, Bakhtiari K, Saeedi M y Engman L. 2013. Multi-faceted reactivity of alkyltellurophenols towards peroxy radicals: catalytic antioxidant versus thiol-depletion effect. *Chemistry* **19**:7510-22
- Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G y Horn TF. 2004. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* **18**:869-71
- Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, y cols.,. 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* **10**:882-90
- Antony S y Bayse CA. 2011. Modeling the mechanism of the glutathione peroxidase mimic ebselen. *Inorg Chem* **50**:12075-84
- Aquilano K, Baldelli S y Ciriolo MR. 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* **5**:196

- Araque A. 2008. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* **4**:3-10
- Araque A, Carmignoto G y Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* **63**:795-813
- Axelrod J, Burch RM y Jelsema CL. 1988. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *Trends Neurosci* **11**:117-23
- Azad GK, Singh V, Mandal P, Singh P, Golla U, y cols.,. 2014. Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. *FEBS Open Bio* **4**:77-89
- Azad GK y Tomar RS. 2014. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep* **41**:4865-79
- Balkrishna SJ, Kumar S, Azad GK, Bhakuni BS, Panini P, y cols.,. 2014. An ebselen like catalyst with enhanced GPx activity via a selenol intermediate. *Org Biomol Chem* **12**:1215-9
- Balsinde J, Winstead MV y Dennis EA. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* **531**:2-6
- Bambrick L, Kristian T y Fiskum G. 2004. Astrocyte mitochondrial mechanisms of ischemic brain injury and neuroprotection. *Neurochem Res* **29**:601-8
- Bano D y Nicotera P. 2007. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* **38**:674-6
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, y cols.,. 1995. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* **26**:497-502
- Barr RK, Kendrick TS y Bogoyevitch MA. 2002. Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol Chem* **277**:10987-97
- Barrett KE, Johnson LR, Ghishan FK, Merchant JL y Said HM. 2006. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*: Elsevier Science
- Beck A, Nieden RZ, Schneider HP y Deitmer JW. 2004. Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium* **35**:47-58
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, y cols.,. 1994. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* **269**:28531-4
- Beckman KB y Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**:547-81
- Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA y Rodriguez AB. 2011. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **108**:14-20
- Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, y cols.,. 2009. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* **46**:392-400
- Belanger M, Allaman I y Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* **14**:724-38
- Belanger M y Magistretti PJ. 2009. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* **11**:281-95
- Belmont PJ, Tadimalla A, Chen WJ, Martindale JJ, Thuerauf DJ, y cols.,. 2008. Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. *J Biol Chem* **283**:14012-21

Bibliografía

- Benitez-King G, Rios A, Martinez A y Anton-Tay F. 1996. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* **1290**:191-6
- Berridge MJ. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* **32**:235-49
- Berridge MJ, Bootman MD y Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:517-29
- Berridge MJ y Irvine RF. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**:197-205
- Berridge MJ, Lipp P y Bootman MD. 2000. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* **287**:1604-5
- Bezprozvanny I, Watras J y Ehrlich BE. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**:751-4
- Bhat SH, Azmi AS y Hadi SM. 2007. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol Appl Pharmacol* **218**:249-55
- Bijian K, Zhang Z, Xu B, Jie S, Chen B, y cols.,. 2012. Synthesis and biological activity of novel organoselenium derivatives targeting multiple kinases and capable of inhibiting cancer progression to metastases. *Eur J Med Chem* **48**:143-52
- Billack B, Santoro M y Lau-Cam C. 2009. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Microb Drug Resist* **15**:77-83
- Bolaños JP, Almeida A y Moncada S. 2010. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* **35**:145-9
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, y cols.,. 2001. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* **12**:3-10
- Bootman MD, Thomas D, Tovey SC, Berridge MJ y Lipp P. 2000. Nuclear calcium signalling. *Cell Mol Life Sci* **57**:371-8
- Borges R, Dominguez N, Estevez-Herrera J, Pereda D y Machado JD. 2012. Vesicular Ca(2+) mediates granule motion and exocytosis. *Cell Calcium* **51**:338-41
- Boutin JA, Audinot V, Ferry G y Delagrange P. 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* **26**:412-9
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, y cols.,. 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**:1969-78
- Brini M, Cali T, Ottolini D y Carafoli E. 2012. Calcium pumps: why so many? *Compr Physiol* **2**:1045-60
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW y Sheu SS. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**:C817-33
- Brune B, Diewald B y Ullrich V. 1991. Ebselen affects calcium homeostasis in human platelets. *Biochem Pharmacol* **41**:1805-11
- Brunk UT y Terman A. 2002. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* **269**:1996-2002

- Bubenik GA. 1980. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm Res* **12**:313-23
- Bull R, Finkelstein JP, Humeres A, Behrens MI y Hidalgo C. 2007. Effects of ATP, Mg²⁺, and redox agents on the Ca²⁺ dependence of RyR channels from rat brain cortex. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**:C162-71
- Bunch L y Krosggaard-Larsen P. 2009. Subtype selective kainic acid receptor agonists: discovery and approaches to rational design. *Med Res Rev* **29**:3-28
- Burcham PC y Kuhan YT. 1996. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem Biophys Res Commun* **220**:996-1001
- Buzzell GR, Chen Z, Vaughan MK y Reiter RJ. 1989. Effects of inhibition of thyroid function and of cold on melatonin synthesis and porphyrin content in the Harderian glands of male Syrian hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **94**:427-9
- Campos-Esparza Mdel R y Torres-Ramos MA. 2010. Neuroprotection by natural polyphenols: molecular mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**:269-77
- Cancela JM. 2001. Specific Ca²⁺ signaling evoked by cholecystinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP3. *Annu Rev Physiol* **63**:99-117
- Carafoli E. 2004. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* **29**:371-9
- Carafoli E y Stauffer T. 1994. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* **25**:312-24
- Cargnello M y Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**:50-83
- Carmignoto G y Gomez-Gonzalo M. 2010. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev* **63**:138-48
- Castellano B y Nieto-Sampedro M. 2001. *Glial cell function*. Amsterdam ; New York: Elsevier. xxi, 757 p. pp.
- Cavallini L, Coassin M y Alexandre A. 1995. Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochem J* **310 (Pt 2)**:449-52
- Cirulli V y Yebra M. 2007. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:296-306
- Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA y Lin LL. 1995. Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**:83-117
- Clemens DL, Calisto LE, Sorrell MF y Tuma DJ. 2003. Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology* **38**:385-93
- Collingridge GL, Olsen R, Peters JA y Spedding M. 2009. Ligand gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**:1
- Collins Y, Chouchani ET, James AM, Menger KE, Cocheme HM y Murphy MP. 2012. Mitochondrial redox signalling at a glance. *J Cell Sci* **125**:801-6
- Condorelli DF, Dell'Albani P, Corsaro M, Giuffrida R, Caruso A, y cols.,. 1997. Metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat astrocytes and human gliomas. *Neurochem Res* **22**:1127-33

Bibliografía

- Constantin RP, Constantin J, Pagadigorria CL, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, y cols.,. 2011. Prooxidant activity of fisetin: effects on energy metabolism in the rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* **25**:117-26
- Constantin RP, do Nascimento GS, Salgueiro CL, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, y cols.,. 2013. Citrus flavanones affect hepatic fatty acid oxidation in rats by acting as prooxidant agents. *Biomed Res Int* **2013**:342973
- Contreras L, Drago I, Zampese E y Pozzan T. 2010. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta* **1797**:607-18
- Cook SA, Sugden PH y Clerk A. 1999. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res* **85**:940-9
- Cooper LL, Li W, Lu Y, Centracchio J, Terentyeva R, y cols.,. 2013. Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca²⁺ handling in ageing rabbit hearts. *J Physiol* **591**:5895-911
- Cosen-Binker LI, Binker MG, Wang CC, Hong W y Gaisano HY. 2008. VAMP8 is the v-SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *J Clin Invest* **118**:2535-51
- Coto-Montes A y Hardeland R. 1999. Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *J Pineal Res* **27**:154-8
- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, y cols.,. 2007. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* **14**:1285-94
- Cseh B, Doma E y Baccarini M. 2014. "RAF" neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett* **588**:2398-406
- Cuadrado A, Moreno-Murciano P y Pedraza-Chaverri J. 2009. The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets* **13**:319-29
- Cuadrado A y Nebreda AR. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**:403-17
- Chan YC y Leung PS. 2011. Co-operative effects of angiotensin II and caerulein in NFκB activation in pancreatic acinar cells in vitro. *Regul Pept* **166**:128-34
- Chandra R y Liddle RA. 2011. Recent advances in pancreatic endocrine and exocrine secretion. *Curr Opin Gastroenterol* **27**:439-43
- Chandra R y Liddle RA. 2013. Modulation of pancreatic exocrine and endocrine secretion. *Curr Opin Gastroenterol* **29**:517-22
- Chandra S, Kable EP, Morrison GH y Webb WW. 1991. Calcium sequestration in the Golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy. *J Cell Sci* **100 (Pt 4)**:747-52
- Chang L y Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40
- Chanson M, Mollard P, Meda P, Suter S y Jongsma HJ. 1999. Modulation of pancreatic acinar cell to cell coupling during ACh-evoked changes in cytosolic Ca²⁺. *J Biol Chem* **274**:282-7
- Chen C, Ono M, Takeshima M y Nakano S. 2014. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of nobiletin against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Anticancer Res* **34**:1785-92

- Chen LD, Tan DX, Reiter RJ, Yaga K, Poeggeler B, y cols.,. 1993. In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on [Ca(2+) + Mg2+]-dependent ATPase in cardiac sarcolemma. *J Pineal Res* **14**:178-83
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, y cols.,. 2001. MAP kinases. *Chem Rev* **101**:2449-76
- Chey WY y Chang T. 2001. Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology* **1**:320-35
- Chih CP, He J, Sly TS y Roberts EL, Jr. 2001. Comparison of glucose and lactate as substrates during NMDA-induced activation of hippocampal slices. *Brain Res* **893**:143-54
- Chinopoulos C, Tretter L y Adam-Vizi V. 1999. Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurochem* **73**:220-8
- Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**:623-34
- Christison J, Sies H y Stocker R. 1994. Human blood cells support the reduction of low-density-lipoprotein-associated cholesteryl ester hydroperoxides by albumin-bound ebselen. *Biochem J* **304 (Pt 2)**:341-5
- Christophe J. 1994. Pancreatic tumoral cell line AR42J: an ampicrine model. *Am J Physiol* **266**:G963-71
- Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD y Williams JA. 1996. Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **271**:5686-90
- Dallwig R y Deitmer JW. 2002. Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* **116**:77-87
- Davies KJ. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**:9895-901
- Davis RJ. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52
- de Almeida EA, Martinez GR, Klitzke CF, de Medeiros MH y Di Mascio P. 2003. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O₂(1Δg)) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res* **35**:131-7
- del Castillo-Vaquero A, Salido GM y Gonzalez A. 2010. Melatonin induces calcium release from CCK-8- and thapsigargin-sensitive cytosolic stores in pancreatic AR42J cells. *J Pineal Res* **49**:256-63
- Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* **269**:13057-60
- Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS y Gonzalez-Gallego J. 2005. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* **135**:2299-304
- Dienel GA y Hertz L. 2001. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res* **66**:824-38
- Dodla MC, Mumaw J y Stice SL. 2010. Role of astrocytes, soluble factors, cells adhesion molecules and neurotrophins in functional synapse formation: implications for human embryonic stem cell derived neurons. *Curr Stem Cell Res Ther* **5**:251-60
- Dolman NJ y Tepikin AV. 2006. Calcium gradients and the Golgi. *Cell Calcium* **40**:505-12

Bibliografía

- Dorn GW, 2nd. 2013. Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicol Pathol* **41**:227-34
- dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, de Almeida LM, Jacques-Silva MC, y cols., 2006. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* **453**:161-7
- Doyle CM y Jamieson JD. 1978. Development of secretagogue response in rat pancreatic acinar cells. *Dev Biol* **65**:11-27
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* **62**:649-71
- Dringen R, Gutterer JM y Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* **267**:4912-6
- Du Y, Zhang H, Lu J y Holmgren A. 2012. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J Biol Chem* **287**:38210-9
- Duan J y Kasper DL. 2011. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology* **21**:401-9
- Dubocovich ML y Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* **27**:101-10
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ y Masana MI. 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* **8**:d1093-108
- Duchen MR. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* **25**:365-451
- Dufresne M, Seva C y Fourmy D. 2006. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev* **86**:805-47
- Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A y Gillespie DA. 2002. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal* **14**:585-93
- Duvernoy HM. 2005. *The human hippocampus : functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI*. Berlin ; New York: Springer. viii, 232 p. pp.
- Eckmann J, Eckert SH, Leuner K, Muller WE y Eckert GP. 2013. Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol* **45**:76-80
- Enslin H, Branch DM y Davis RJ. 2000. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J* **19**:1301-11
- Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Xavier S, Citrin D, y cols., 2002. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann N Y Acad Sci* **962**:195-206
- Estevez AO, Morgan KL, Szewczyk NJ, Gems D y Estevez M. 2014. The neurodegenerative effects of selenium are inhibited by FOXO and PINK1/PTEN regulation of insulin/insulin-like growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* **41**:28-43
- Estival A, Pradel P, Wicker-Planquart C, Vaysse N, Puigserver A y Clemente F. 1991. Regulation of amylase and chymotrypsinogen expression by dexamethasone and caerulein in serum-free-cultured pancreatic acinar AR4-2J cells. Influence of glucose. *Biochem J* **279** (Pt 1):197-201

- Eysseric H, Gonthier B, Soubeyran A, Richard MJ, Daveloose D y Barret L. 2000. Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* **21**:117-25
- Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, y cols.,. 2010. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* **63**:26-38
- Fakhari S, Abdolmohammadi K, Panahi Y, Nikkhoo B, Peirmohammadi H, y cols.,. 2014. Glycyrrhizin attenuates tissue injury and reduces neutrophil accumulation in experimental acute pancreatitis. *Int J Clin Exp Pathol* **7**:101-9
- Favrot L, Grzegorzewicz AE, Lajiness DH, Marvin RK, Boucau J, y cols.,. 2013. Mechanism of inhibition of Mycobacterium tuberculosis antigen 85 by ebselen. *Nat Commun* **4**:2748
- Fedorenko ALL, N. A.; Volkova, T. M.; Kryshtal, O. A. 2006. Antioxidant-caused changes in the permeability of proton-gated ion channels for sodium and calcium. *Neurophysiology* **38**:4
- Felten DL y Shetty AN. 2010. *Netter's atlas of neuroscience*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xviii, 438 p. pp.
- Fernandez-Sanchez M, del Castillo-Vaquero A, Salido GM y Gonzalez A. 2009. Ethanol exerts dual effects on calcium homeostasis in CCK-8-stimulated mouse pancreatic acinar cells. *BMC Cell Biol* **10**:77
- Finkel T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **10**:248-53
- Flora SJ. 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* **2**:191-206
- Forsyth R, Fray A, Boutelle M, Fillenz M, Middleditch C y Burchell A. 1996. A role for astrocytes in glucose delivery to neurons? *Dev Neurosci* **18**:360-70
- Forsyth RJ. 1996. Astrocytes and the delivery of glucose from plasma to neurons. *Neurochem Int* **28**:231-41
- Fradejas N, Pastor MD, Burgos M, Beyaert R, Tranque P y Calvo S. 2010. Caspase-11 mediates ischemia-induced astrocyte death: involvement of endoplasmic reticulum stress and C/EBP homologous protein. *J Neurosci Res* **88**:1094-105
- Frederick RL y Shaw JM. 2007. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* **8**:1668-75
- Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, Yamauchi S, Saitoh M, y cols.,. 2007. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol* **27**:8152-63
- Fukuhara K, Nagakawa M, Nakanishi I, Ohkubo K, Imai K, y cols.,. 2006. Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). *Bioorg Med Chem* **14**:1437-43
- Funchal C, Moretto MB, Vivian L, Zeni G, Rocha JB y Pessoa-Pureur R. 2006. Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* **222**:143-53
- Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N y Mikoshiba K. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* **342**:32-8

Bibliografía

- García-Sánchez L, Santofimia-Castano P, Miro-Moran A, Tapia JA, Salido GM y González A. 2012. Resveratrol mobilizes Ca²⁺ from intracellular stores and induces c-Jun N-terminal kinase activation in tumoral AR42J cells. *Mol Cell Biochem* **362**:15-23
- Gardner JD y Jackson MJ. 1977. Regulation of amylase release from dispersed pancreatic acinar cells. *J Physiol* **270**:439-54
- Gardner JD, Sutliff VE, Walker MD y Jensen RT. 1983. Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on actions of cholecystokinin, bombesin, and carbachol on pancreatic acini. *Am J Physiol* **245**:G676-80
- Gärtner A y Frantz D. 2010. *Hippocampus : anatomy, functions and neurobiology*. New York: Nova Science. xi, 196 p. pp.
- Gasslander T, Smeds S, Blomqvist L y Ihse I. 1990. Proliferative response of different exocrine pancreatic cell types to hormonal stimuli. I. Effects of long-term cerulein administration. *Scand J Gastroenterol* **25**:1103-10
- Gerasimenko JV, Sherwood M, Tepikin AV, Petersen OH y Gerasimenko OV. 2006. NAADP, cADPR and IP3 all release Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci* **119**:226-38
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV y Petersen OH. 1996. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* **84**:473-80
- Githens S. 1988. The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**:486-506
- Githens S. 1991. Glutathione metabolism in the pancreas compared with that in the liver, kidney, and small intestine. *Int J Pancreatol* **8**:97-109
- Go VLW. 1986. *The Exocrine pancreas: biology, pathobiology, and diseases*: Raven Press
- Gogvadze V, Klein SD, Shigenaga M, Ames BN y Richter C. 2000. Effect of ebselen on Ca²⁺ transport in mitochondria. *Redox Rep* **5**:359-63
- Goldstein GW. 1988. Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* **529**:31-9
- Gomes FC, Paulin D y Moura Neto V. 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* **32**:619-31
- González A, del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia JA y Salido GM. 2011. Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J Pineal Res* **50**:250-60
- González A, Granados MP, Pariente JA y Salido GM. 2006a. H₂O₂ mobilizes Ca²⁺ from agonist- and thapsigargin-sensitive and insensitive intracellular stores and stimulates glutamate secretion in rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* **31**:741-50
- González A, Granados MP, Salido GM y Pariente JA. 2003. Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **15**:1039-48
- González A, Nunez AM, Granados MP, Pariente JA y Salido GM. 2006b. Ethanol impairs CCK-8-evoked amylase secretion through Ca²⁺-mediated ROS generation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol* **38**:51-7

- Gonzalez A y Salido GM. 2001. Participation of mitochondria in calcium signalling in the exocrine pancreas. *J Physiol Biochem* **57**:331-9
- Gonzalez A, Santofimia-Castano P, Rivera-Barreno R y Salido GM. 2012. Cinnamtannin B-1, a natural antioxidant that reduces the effects of H₂O₂ on CCK-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol Biochem* **68**:181-91
- Gonzalez A, Schmid A, Salido GM, Camello PJ y Pariente JA. 2002. XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **14**:153-9
- Gonzalez A, Schmid A, Sternfeld L, Krause E, Salido GM y Schulz I. 1999. Cholecystokinin-evoked Ca²⁺ waves in isolated mouse pancreatic acinar cells are modulated by activation of cytosolic phospholipase A₂, phospholipase D, and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **261**:726-33
- Gonzalez A, Schulz I y Schmid A. 2000. Agonist-evoked mitochondrial Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **275**:38680-6
- Grace MS, Cahill GM y Besharse JC. 1991. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res* **559**:56-63
- Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM y Gorelick FS. 1998. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* **275**:G1010-7
- Granados MP, Salido GM, Pariente JA y Gonzalez A. 2004. Generation of ROS in response to CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Mitochondrion* **3**:285-96
- Green AR y Ashwood T. 2005. Free radical trapping as a therapeutic approach to neuroprotection in stroke: experimental and clinical studies with NXY-059 and free radical scavengers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**:109-18
- Grynkiewicz G, Poenie M y Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**:3440-50
- Guerin PJ y Gauthier ER. 2003. Induction of cellular necrosis by the glutathione peroxidase mimetic ebselen. *J Cell Biochem* **89**:203-11
- Guerrero JM y Reiter RJ. 2002. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* **2**:167-79
- Gukovskaya A y Pandol S. 1994. Nitric oxide production regulates cGMP formation and calcium influx in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* **266**:G350-6
- Gukovskaya AS y Gukovsky I. 2011. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology* **140**:1876-80
- Guthrie J, Williams JA y Logsdon CD. 1991. Growth and differentiation of pancreatic acinar cells: independent effects of glucocorticoids on AR42J cells. *Pancreas* **6**:506-13
- Gyorke S, Gyorke I, Lukyanenko V, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S y Wiesner TF. 2002. Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by luminal calcium in cardiac muscle. *Front Biosci* **7**:d1454-63
- Haimov I, Lavie P, Laudon M, Herer P, Vigder C y Zisapel N. 1995. Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep* **18**:598-603
- Halassa MM, Fellin T y Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* **13**:54-63

Bibliografía

- Halassa MM y Haydon PG. 2010. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* **72**:335-55
- Halenda SP, Wu H, Jones AW y Shukla SD. 1996. Phospholipase D in platelets and megakaryocytic cells. *Chem Phys Lipids* **80**:21-6
- Halliwell B. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* **55**:S44-9; discussion S9-52
- Halliwell B y Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**:231-55
- Hamilton NB y Attwell D. 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* **11**:227-38
- Hanks SK, Quinn AM y Hunter T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**:42-52
- Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C y Lillig CH. 2013. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal* **19**:1539-605
- Hansson E y Ronnback L. 2004. Astrocytic receptors and second messenger systems. *Advances in Molecular and Cell Biology* **31**:475-501
- Hardeland R. 2005. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* **27**:119-30
- Hardeland R. 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* **65**:2001-18
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**:298-300
- Hassan W, Ibrahim M y Rocha JB. 2010. Diphenyl diselenide behaves differently than ebselen under different pH media in rat's liver preparations. *Pathol Res Pract* **206**:357-60
- Hatton GI y Parpura V. 2004. *Glial neuronal signaling*. Boston: Kluwer Academic Publishers. xi, 441 p. pp.
- Hattori R, Yui Y, Shinoda E, Inoue R, Aoyama T, y cols.,. 1996. Effect of ebselen on bovine and rat nitric oxide synthase activity is modified by thiols. *Jpn J Pharmacol* **72**:191-3
- Hausmann S, Kong B, Michalski C, Erkan M y Friess H. 2014. The role of inflammation in pancreatic cancer. *Adv Exp Med Biol* **816**:129-51
- Haydon PG y Carmignoto G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* **86**:1009-31
- He L, Linden DJ y Sapirstein A. 2012. Astrocyte inositol triphosphate receptor type 2 and cytosolic phospholipase A2 alpha regulate arteriole responses in mouse neocortical brain slices. *PLoS One* **7**:e42194
- Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ y Wakelam MJ. 1998. Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* **23**:200-4
- Hoensch HP y Kirch W. 2005. Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. *Int J Gastrointest Cancer* **35**:187-95

- Hojjman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE y Pecci A. 2004. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* **145**:418-25
- Hong JH, Li Q, Kim MS, Shin DM, Feske S, y cols.. 2011. Polarized but differential localization and recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC channels in secretory cells. *Traffic* **12**:232-45
- Hosfield CM, Elce JS, Davies PL y Jia Z. 1999. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J* **18**:6880-9
- Hoth M, Fanger CM y Lewis RS. 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* **137**:633-48
- Hoth M y Penner R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**:353-6
- Huai J, Shao Y, Sun X, Jin Y, Wu J y Huang Z. 2012. Melatonin ameliorates acute necrotizing pancreatitis by the regulation of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Pancreatology* **12**:257-63
- Huether G. 1993. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* **49**:665-70
- Huether G, Poeggeler B, Reimer A y George A. 1992. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* **51**:945-53
- Hughes E, Lee AK y Tse A. 2006. Dominant role of sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump in Ca²⁺ homeostasis and exocytosis in rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **147**:1396-407
- Huneycutt BS y Benveniste EN. 1995. Regulation of astrocyte cell biology by the cAMP/protein kinase A signaling pathway. *Adv Neuroimmunol* **5**:261-9
- Huther AM, Zhang Y, Sauer A y Parnham MJ. 1989. Antimalarial properties of ebselen. *Parasitol Res* **75**:353-60
- Ianas O, Olinescu R y Badescu I. 1991. Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie* **29**:147-53
- Ichas F, Jouaville LS y Mazat JP. 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**:1145-53
- Ignarro LJ y Kadowitz PJ. 1985. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**:171-91
- Imagawa T, Smith JS, Coronado R y Campbell KP. 1987. Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca²⁺-permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* **262**:16636-43
- Ishii T, Asai T, Urakami T y Oku N. 2010. Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion. *Brain Res* **1321**:164-8
- Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A y Sumi Y. 1997. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* **136**:7-13
- Jahn R y Scheller RH. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:631-43

Bibliografía

- Jakovcevic D y Harder DR. 2007. Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. *Curr Top Dev Biol* **79**:75-97
- Jaworek J. 2006. Ghrelin and melatonin in the regulation of pancreatic exocrine secretion and maintaining of integrity. *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 5**:83-96
- Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, y cols.,. 2003. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* **34**:40-52
- Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Szklarczyk J, y cols.,. 2007. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol* **58 Suppl 6**:65-80
- Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A y Konturek SJ. 2010a. Brain-gut axis in the modulation of pancreatic enzyme secretion. *J Physiol Pharmacol* **61**:523-31
- Jaworek J, Nawrot K, Konturek SJ, Leja-Szpak A, Thor P y Pawlik WW. 2004. Melatonin and its precursor, L-tryptophan: influence on pancreatic amylase secretion in vivo and in vitro. *J Pineal Res* **36**:155-64
- Jaworek J, Zwirska-Korczala K, Szklarczyk J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, y cols.,. 2010b. Pinelectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacol Rep* **62**:864-73
- Jetten AM. 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* **7**:e003
- Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM y Logsdon CD. 2001. Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology* **121**:1380-90
- Johnson LR. 1994. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press. 2 v. (xx, 2202 p.) pp.
- Kade IJ, Balogun BD y Rocha JB. 2013. In vitro glutathione peroxidase mimicry of ebselen is linked to its oxidation of critical thiols on key cerebral suphydryl proteins - A novel component of its GPx-mimic antioxidant mechanism emerging from its thiol-modulated toxicology and pharmacology. *Chem Biol Interact* **206**:27-36
- Kalayci M, Coskun O, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, y cols.,. 2005. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* **30**:403-10
- Kanner J, German JB y Kinsella JE. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* **25**:317-64
- Kanno T. 1998. Ca²⁺ signaling in the pancreatic acinus. *Pancreas* **16**:273-6
- Kasai H, Li YX y Miyashita Y. 1993. Subcellular distribution of Ca²⁺ release channels underlying Ca²⁺ waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell* **74**:669-77
- Keyse SM y Tyrrell RM. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:99-103
- Khalatbary AR. 2013. Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutr Neurosci* **16**:243-9
- Kim CH y Yoo YM. 2010. Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via p53 in LNCaP Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* **14**:365-9
- Kim YH, Joo HS y Kim DS. 2010. Nitric oxide induction of IRE1-alpha-dependent CREB phosphorylation in human glioma cells. *Nitric Oxide* **23**:112-20

- Koizumi H, Fujisawa H, Suehiro E, Shirao S y Suzuki M. 2011. Neuroprotective effects of ebselen following forebrain ischemia: involvement of glutamate and nitric oxide. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **51**:337-43
- Koizumi S. 2010. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J* **277**:286-92
- Kolar J y Machackova I. 2005. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J Pineal Res* **39**:333-41
- Kolodecik T, Shugrue C, Ashat M y Thrower EC. 2013. Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. *Front Physiol* **4**:415
- Korkmaz A, Tamura H, Manchester LC, Ogden GB, Tan DX y Reiter RJ. 2009. Combination of melatonin and a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist induces apoptosis in a breast cancer cell line. *J Pineal Res* **46**:115-6
- Kosarikov DN, Young P, Uversky VN y Gerber NC. 2001. Human soluble guanylate cyclase: functional expression, purification and structural characterization. *Arch Biochem Biophys* **388**:185-97
- Krupinski J. 1991. The adenylyl cyclase family. *Mol Cell Biochem* **104**:73-9
- Krych J, Gebicki JL y Gebicka L. 2014. Flavonoid-induced conversion of catalase to its inactive form-Compound II. *Free Radic Res*:1-8
- Kyriakis JM y Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA y Verkhratsky A. 2006. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* **26**:2673-83
- Lam AK y Galione A. 2013. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim Biophys Acta* **1833**:2542-59
- LeBeau AP, Yule DI, Groblewski GE y Sneyd J. 1999. Agonist-dependent phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A possible mechanism for agonist-specific calcium oscillations in pancreatic acinar cells. *J Gen Physiol* **113**:851-72
- Lee J, Koo N y Min DB. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **3**:21-33
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX y Reiter RJ. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* **75**:765-90
- Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF y Barberger-Gateau P. 2007. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol* **165**:1364-71
- Leung PS y Chan YC. 2009. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal* **11**:135-65
- Li J, Chen JJ, Zhang F y Zhang C. 2000. Ebselen protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HL-60 cells. *Acta Pharmacol Sin* **21**:455-9
- Li LH, Tian XR, Jiang Z, Zeng LW, He WF y Hu ZP. 2013. The Golgi Apparatus: Panel Point of Cytosolic Ca²⁺ Regulation. *Neurosignals*
- Liebmann C. 2001. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* **13**:777-85
- Lipp P y Niggli E. 1994. Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* **474**:439-46

Bibliografía

- Logsdon CD, Moessner J, Williams JA y Goldfine ID. 1985. Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles, and secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Cell Biol* **100**:1200-8
- Logsdon CD, Perot KJ y McDonald AR. 1987. Mechanism of glucocorticoid-induced increase in pancreatic amylase gene transcription. *J Biol Chem* **262**:15765-9
- Longnecker DS, Lilja HS, French J, Kuhlmann E y Noll W. 1979. Transplantation of azaserine-induced carcinomas of pancreas in rats. *Cancer Lett* **7**:197-202
- Lu X, Ma L, Ruan L, Kong Y, Mou H, y cols.,. 2010. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation* **7**:46
- Lu Z y Xu S. 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* **58**:621-31
- Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, y cols.,. 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* **24**:3603-24
- Lugokenski TH, Muller LG, Taube PS, Rocha JB y Pereira ME. 2011. Inhibitory effect of ebselen on lactate dehydrogenase activity from mammals: a comparative study with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Drug Chem Toxicol* **34**:66-76
- Luik RM, Wu MM, Buchanan J y Lewis RS. 2006. The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* **174**:815-25
- Llc B. 2010. *Pancreas Anatomy: Islets of Langerhans, Pancreatic Duct, Ampulla of Vater, Tail of Pancreas, Uncinate Process of Pancreas, Head of Pancreas*: General Books LLC
- Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, y cols.,. 2003. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* **270**:832-40
- Magistretti PJ. 2011. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol* **96**:407-10
- Magistretti PJ y Pellerin L. 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**:1155-63
- Maharaj DS, Walker RB, Glass BD y Daya S. 2003. 6-Hydroxymelatonin protects against cyanide induced oxidative stress in rat brain homogenates. *J Chem Neuroanat* **26**:103-7
- Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS y Cooper AJ. 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* **62**:45-53
- Malarkey EB y Parpura V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* **52**:142-54
- Manso MA, Garcia-Montero AC, Tabernero MD, Orfao A y De Dios I. 1999. The recovery of acute pancreatitis depends on the enzyme amount stored in zymogen granules at early stages. *Mol Cell Biochem* **200**:35-41
- Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A y Brunner TB. 2011. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling. *Cancer Res* **71**:3453-8
- Marczewska J, Kozirowska JH y Anuszewska EL. 2000. Influence of ascorbic acid on cytotoxic activity of copper and iron ions in vitro. *Acta Pol Pharm* **57**:415-8

- Martin-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andres O, Gonzalez P y Gonzalez-Gallego J. 2008. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* **45**:532-40
- Martin M, Macias M, Escames G, Leon J y Acuna-Castroviejo D. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* **14**:1677-9
- Martinson EA, Scheible S y Presek P. 1994. Inhibition of phospholipase D of human platelets by protein tyrosine kinase inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **40**:627-34
- Matthews GG. 2001. *Neurobiology : molecules, cells, and systems*. Malden, MA: Blackwell Science. xxi, 563 p. pp.
- McCord JM y Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**:6049-55
- McNiven MA y Marlowe KJ. 1999. Contributions of molecular motor enzymes to vesicle-based protein transport in gastrointestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **116**:438-51
- Meda P. 1996. Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**:1053-7
- Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H y Missiaen L. 2011. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
- Meldolesi J, Madeddu L y Pozzan T. 1990. Intracellular Ca²⁺ storage organelles in non-muscle cells: heterogeneity and functional assignment. *Biochim Biophys Acta* **1055**:130-40
- Mellor H y Parker PJ. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* **332 (Pt 2)**:281-92
- Meng Q y Xia Y. 2011. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* **2**:889-98
- Metcalfe EE, Traaseth NJ y Veglia G. 2005. Serine 16 phosphorylation induces an order-to-disorder transition in monomeric phospholamban. *Biochemistry* **44**:4386-96
- Mhatre MC, van Jaarsveld AS y Reiter RJ. 1988. Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* **153**:1186-92
- Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP y Maestroni GJ. 2006. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* **87**:81-7
- Miorelli ST, Rosa RM, Moura DJ, Rocha JC, Lobo LA, y cols.,. 2008. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis* **23**:93-9
- Mishra B, Priyadarsini KI, Mohan H y Mugesh G. 2006. Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant activity of ebselen and related organoselenium compounds. *Bioorg Med Chem Lett* **16**:5334-8
- Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, y cols.,. 2000. Abnormal intracellular ca(2+)homeostasis and disease. *Cell Calcium* **28**:1-21
- Mittal CK y Murad F. 1977. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:4360-4

Bibliografía

- Miyasaka K, Jimi A, Kanai S, Sato Y, Masuda M, y cols.,. 1998. Incidence of apoptosis in the pancreas of young and old rats. *Arch Gerontol Geriatr* **26**:235-45
- Monteith GR y Roufogalis BD. 1995. The plasma membrane calcium pump--a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium* **18**:459-70
- Montero M, Alonso MT, Albillos A, Garcia-Sancho J y Alvarez J. 2001. Mitochondrial Ca(2+)-induced Ca(2+) release mediated by the Ca(2+) uniporter. *Mol Biol Cell* **12**:63-71
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, y cols.,. 2000. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* **2**:57-61
- Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, y cols.,. 2004. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* **68**:1939-46
- Moustafa A, Sakamoto KQ y Habara Y. 2011. A fundamental role for NO-PLC signaling pathway in mediating intracellular Ca²⁺ oscillation in pancreatic acini. *Nitric Oxide* **24**:139-50
- Murphy JA, Criddle DN, Sherwood M, Chvanov M, Mukherjee R, y cols.,. 2008. Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **135**:632-41
- Murphy MP. 2001. How understanding the control of energy metabolism can help investigation of mitochondrial dysfunction, regulation and pharmacology. *Biochim Biophys Acta* **1504**:1-11
- Murphy MP. 2006. Induction of mitochondrial ROS production by electrophilic lipids: a new pathway of redox signaling? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H1754-5
- Murphy MP. 2012. Modulating mitochondrial intracellular location as a redox signal. *Sci Signal* **5**:pe39
- Nagi MN, Laguna JC, Cook L y Cinti DL. 1989. Disruption of rat hepatic microsomal electron transport chains by the selenium-containing anti-inflammatory agent Ebselen. *Arch Biochem Biophys* **269**:264-71
- Nair J, Sinitsina O, Vasunina EA, Nevinsky GA, Laval J y Bartsch H. 2005. Age-dependent increase of etheno-DNA-adducts in liver and brain of ROS overproducing OXYS rats. *Biochem Biophys Res Commun* **336**:478-82
- Naranjo MC, Guerrero JM, Rubio A, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, y cols.,. 2007. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci* **64**:781-90
- Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, y cols.,. 2014. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal* **21**:66-85
- Nedergaard M, Rodriguez JJ y Verkhratsky A. 2010. Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium* **47**:140-9
- Neves G, Cooke SF y Bliss TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* **9**:65-75
- Nguyen PV y Woo NH. 2003. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* **71**:401-37
- Niebergall-Roth E y Singer MV. 2003. Control of pancreatic exocrine secretion via muscarinic receptors: which subtype(s) are involved? A review. *Pancreatol* **3**:284-92

- Niederer C, Luthen R y Heintges T. 1994. Effects of CCK on pancreatic function and morphology. *Ann N Y Acad Sci* **713**:180-98
- Niederer C, Ude K, Niederer M, Luthen R, Strohmeyer G, y cols.,. 1991. Effects of the seleno-organic substance Ebselen in two different models of acute pancreatitis. *Pancreas* **6**:282-90
- Nishina H, Wada T y Katada T. 2004. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* **136**:123-6
- Nishizuka Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**:607-14
- Nogueira CW, Rotta LN, Zeni G, Souza DO y Rocha JB. 2002. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* **27**:283-8
- North RA. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**:1013-67
- Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM y Touitou Y. 2000. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci* **68**:387-99
- Ozawa T. 1999. Ryanodine-sensitive Ca(2+) release mechanism of rat pancreatic acinar cells is modulated by calmodulin. *Biochim Biophys Acta* **1452**:254-62
- Ozawa T y Schulz I. 1991. H+ uptake increases GTP-induced connection of inositol 1,4,5-trisphosphate- and caffeine-sensitive calcium pools in pancreatic microsomal vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **180**:755-64
- Pablos MI, Chuang J, Reiter RJ, Ortiz GG, Daniels WM, y cols.,. 1995. Time course of the melatonin-induced increase in glutathione peroxidase activity in chick tissues. *Biol Signals* **4**:325-30
- Palygin O, Lalo U y Pankratov Y. 2011. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br J Pharmacol* **163**:1755-66
- Park HS, Betzenhauser MJ, Won JH, Chen J y Yule DI. 2008. The type 2 inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3) receptor determines the sensitivity of InsP3-induced Ca2+ release to ATP in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **283**:26081-8
- Park MK, Ashby MC, Erdemli G, Petersen OH y Tepikin AV. 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J* **20**:1863-74
- Parnham MJ y Sies H. 2013. The early research and development of ebselen. *Biochem Pharmacol* **86**:1248-53
- Patel AJ, Weir MD, Hunt A, Tahourdin CS y Thomas DG. 1985. Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation of glutamine synthetase with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. *Brain Res* **331**:1-9
- Patel S y Docampo R. 2010. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca2+ signaling. *Trends Cell Biol* **20**:277-86
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, y cols.,. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-83
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, y cols.,. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* **55**:1251-62

Bibliografía

- Perea G y Araque A. 2005. Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *J Neural Transm* **112**:127-35
- Perea G y Araque A. 2010. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* **63**:93-102
- Perea G, Navarrete M y Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* **32**:421-31
- Perez-Ortiz JM, Tranque P, Vaquero CF, Domingo B, Molina F, y cols.,. 2004. Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* **279**:8976-85
- Perkins PS, Bahrami LH, Lenhard LW y Pandol SJ. 1991. Intracellular mechanisms involved in short-term regulation of net protein synthesis in pancreatic acini. *Biochim Biophys Acta* **1092**:145-52
- Petersen OH. 1992. Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol* **448**:1-51
- Petersen OH. 1995. Local calcium spiking in pancreatic acinar cells. *Ciba Found Symp* **188**:85-94; discussion -103
- Petersen OH. 2009. Ca²⁺ signaling in pancreatic acinar cells: physiology and pathophysiology. *Braz J Med Biol Res* **42**:9-16
- Petersen OH, Gerasimenko OV, Tepikin AV y Gerasimenko JV. 2011. Aberrant Ca(2+) signalling through acidic calcium stores in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* **50**:193-9
- Petersen OH y Sutton R. 2006. Ca²⁺ signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci* **27**:113-20
- Pham-Huy LA, He H y Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* **4**:89-96
- Philipson KD y Nicoll DA. 2000. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* **62**:111-33
- Phillips PA, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, y cols.,. 2010. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:17397-402
- Pin JP, De Colle C, Bessis AS y Acher F. 1999. New perspectives for the development of selective metabotropic glutamate receptor ligands. *Eur J Pharmacol* **375**:277-94
- Pinton P, Pozzan T y Rizzuto R. 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **17**:5298-308
- Pirttimaki TM, Hall SD y Parri HR. 2011. Sustained neuronal activity generated by glial plasticity. *J Neurosci* **31**:7637-47
- Pivovarova NB y Andrews SB. 2010. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J* **277**:3622-36
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, y cols.,. 1994. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **738**:419-20
- Poli M, Gatta LB, Dominici R, Lovati C, Mariani C, y cols.,. 2005. DNA sequence variations in the prolyl isomerase Pin1 gene and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **389**:66-70

- Porter JT y McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* **51**:439-55
- Powell EM, Meiners S, DiProspero NA y Geller HM. 1997. Mechanisms of astrocyte-directed neurite guidance. *Cell Tissue Res* **290**:385-93
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P y Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* **74**:595-636
- Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S y Rajanikant GK. 2012. Oxidative stress--assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol* **50**:219-30
- Puntel RL, Roos DH, Seeger RL y Rocha JB. 2013. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol In Vitro* **27**:59-70
- Purkayastha S, Berliner A, Fernando SS, Ranasinghe B, Ray I, y cols., 2009. Curcumin blocks brain tumor formation. *Brain Res* **1266**:130-8
- Putney JW, Jr. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**:1-12
- Qin F, Siwik DA, Lancel S, Zhang J, Kuster GM, y cols., 2013. Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart. *J Am Heart Assoc* **2**:e000184
- Quintanilla RA, Jin YN, von Bernhardt R y Johnson GV. 2013. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Mol Neurodegener* **8**:45
- Radomski MW, Palmer RM y Moncada S. 1987. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **92**:639-46
- Rahman SH, Ibrahim K, Larvin M, Kingsnorth A y McMahon MJ. 2004. Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* **126**:1312-22
- Rajasekaran AK, Morimoto T, Hanzel DK, Rodriguez-Boulan E y Kreibich G. 1993. Structural reorganization of the rough endoplasmic reticulum without size expansion accounts for dexamethasone-induced secretory activity in AR42J cells. *J Cell Sci* **105 (Pt 2)**:333-45
- Reiter RJ. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* **12**:151-80
- Reiter RJ y Tan DX. 2003. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* **34**:79-80
- Reiter RJ, Tan DX y Fuentes-Broto L. 2010. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* **181**:127-51
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC y El-Sawi MR. 2002a. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Ann N Y Acad Sci* **959**:238-50
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, y cols., 2007. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nutr Diet* **97**:211-30
- Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC y Lopez-Burillo S. 2002b. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* **54**:1299-321
- Repasky GA, Chenette EJ y Der CJ. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* **14**:639-47

Bibliografía

- Rinaldi A, Oliverio A y Mele A. 2012. Spatial memory, plasticity and nucleus accumbens. *Rev Neurosci* **23**:527-41
- Rivera-Barreno R, del Castillo-Vaquero A, Salido GM y Gonzalez A. 2010. Effect of cinnamtannin B-1 on cholecystokinin-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**:980-8
- Roderick HL, Lechleiter JD y Camacho P. 2000. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* **149**:1235-48
- Rodriguez C, Martin V, Herrera F, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, y cols.,. 2013. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci* **14**:6597-613
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, y cols.,. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* **36**:1-9
- Ronkina N, Kotlyarov A, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Hitti E, y cols.,. 2007. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Mol Cell Biol* **27**:170-81
- Rosado JA, Gonzalez A, Salido GM y Pariente JA. 2002. Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **14**:547-56
- Rosewicz S, Vogt D, Harth N, Grund C, Franke WW, y cols.,. 1992. An amphicrine pancreatic cell line: AR42J cells combine exocrine and neuroendocrine properties. *Eur J Cell Biol* **59**:80-91
- Roskoski R, Jr. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* **66**:105-43
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K y Giaume C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* **322**:1551-5
- Roux PP y Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:320-44
- Roy SS y Hajnoczky G. 2008. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods* **46**:213-23
- Rubinfeld H y Seger R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* **31**:151-74
- Rubio S, Estevez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J y Quintana J. 2007. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* **42**:131-8
- Russo M, Palumbo R, Tedesco I, Mazzarella G, Russo P, y cols.,. 1999. Quercetin and anti-CD95(Fas/Apo1) enhance apoptosis in HPB-ALL cell line. *FEBS Lett* **462**:322-8
- Rutten WJ, de Pont JJ y Bonting SL. 1972. Adenylate cyclase in the rat pancreas properties and stimulation by hormones. *Biochim Biophys Acta* **274**:201-13
- Rzagalinski BA, Weber JT, Willoughby KA y Ellis EF. 1998. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. *J Neurochem* **70**:2377-85
- Sabapathy K. 2012. Role of the JNK pathway in human diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **106**:145-69

- Sabbatini ME, Bi Y, Ji B, Ernst SA y Williams JA. 2010. CCK activates RhoA and Rac1 differentially through Galpha13 and Galphaq in mouse pancreatic acini. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**:C592-601
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, y cols.,. 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* **17**:2596-606
- Salazar M, Pariente JA, Salido GM y Gonzalez A. 2008a. Ebselen increases cytosolic free Ca²⁺ concentration, stimulates glutamate release and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Toxicology* **244**:280-91
- Salazar M, Pariente JA, Salido GM y Gonzalez A. 2008b. Ethanol induces glutamate secretion by Ca²⁺ mobilization and ROS generation in rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Int* **52**:1061-7
- Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL y Steer ML. 1999. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* **276**:G835-42
- Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA y Dudeja V. 2007. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu Rev Physiol* **69**:249-69
- Samuel I, Zaheer S, Nelson JJ, Yorek MA y Zaheer A. 2004. CCK-A receptor induction and P38 and NF-kappaB activation in acute pancreatitis. *Pancreatology* **4**:49-56
- Sanchez-Hidalgo M, Lee M, de la Lastra CA, Guerrero JM y Packham G. 2012. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. *J Pineal Res* **53**:366-73
- Sanchez-Sanchez AM, Martin V, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, y cols.,. 2011. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. *Free Radic Res* **45**:1333-41
- Sanderson JL y Dell'Acqua ML. 2011. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. *Neuroscientist* **17**:321-36
- Sanfey H, Sarr MG, Bulkley GB y Cameron JL. 1986. Oxygen-derived free radicals and acute pancreatitis: a review. *Acta Physiol Scand Suppl* **548**:109-18
- Santandreu FM, Valle A, Oliver J y Roca P. 2011. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cell Physiol Biochem* **28**:219-28
- Santo-Domingo J y Demaurex N. 2010. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1797**:907-12
- Santofimia-Castano P, Salido GM y Gonzalez A. 2011. Ethanol reduces kainate-evoked glutamate secretion in rat hippocampal astrocytes. *Brain Res* **1402**:1-8
- Saris NE y Carafoli E. 2005. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* **70**:187-94
- Schoenberg MH, Buchler M y Beger HG. 1994. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* **41**:313-9
- Schools GP y Kimelberg HK. 1999. mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J Neurosci Res* **58**:533-43

Bibliografía

- Schreck R, Rieber P y Baeuerle PA. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **10**:2247-58
- Seamer LB, GF; Duque, R. 1993. *Handbook of flow cytometry methods*. New York: Wiley-Liss. xii, 246 p. pp.
- Seifert G y Steinhauser C. 2001. Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Prog Brain Res* **132**:287-99
- Sena LA y Chandel NS. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* **48**:158-67
- Seo JY, Masamune A, Shimosegawa T y Kim H. 2009. Protective effect of lycopene on oxidative stress-induced cell death of pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci* **1171**:570-5
- Servitja JM, Masgrau R, Pardo R, Sarri E, von Eichel-Streiber C, y cols.,. 2003. Metabotropic glutamate receptors activate phospholipase D in astrocytes through a protein kinase C-dependent and Rho-independent pathway. *Neuropharmacology* **44**:171-80
- Sharma SS, Kumar A, Arora M y Kaundal RK. 2009. Neuroprotective potential of combination of resveratrol and 4-amino 1,8 naphthalimide in experimental diabetic neuropathy: focus on functional, sensorimotor and biochemical changes. *Free Radic Res* **43**:400-8
- Shelton MK y McCarthy KD. 1999. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* **26**:1-11
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A y Der CJ. 2000. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* **10**:147-54
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, y cols.,. 1997. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* **17**:7503-22
- Siegel G, Sternfeld L, Gonzalez A, Schulz I y Schmid A. 2001. Arachidonic acid modulates the spatiotemporal characteristics of agonist-evoked Ca²⁺ waves in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **276**:16986-91
- Sies H. 1993. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* **14**:313-23
- Simeone TA, Sanchez RM y Rho JM. 2004. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol* **19**:343-60; discussion 61
- Simon MI, Strathmann MP y Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**:802-8
- Simpson PB, Holtzclaw LA, Langley DB y Russell JT. 1998. Characterization of ryanodine receptors in oligodendrocytes, type 2 astrocytes, and O-2A progenitors. *J Neurosci Res* **52**:468-82
- Singh N, Halliday AC, Thomas JM, Kuznetsova OV, Baldwin R, y cols.,. 2013. A safe lithium mimetic for bipolar disorder. *Nat Commun* **4**:1332
- Sitaram BR y Lees GJ. 1978. Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* **31**:1021-6
- Sitsapesan R y Williams AJ. 1990. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Physiol* **423**:425-39

- Sivagami G, Vinothkumar R, Bernini R, Preethy CP, Riyasdeen A, y cols.,. 2012. Role of hesperetin (a natural flavonoid) and its analogue on apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cell line--a comparative study. *Food Chem Toxicol* **50**:660-71
- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS y Slominski AT. 2012. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* **351**:152-66
- Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ y Russell JT. 2000. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* **32**:35-46
- Smirnov AN. 2001. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* **66**:19-26
- Smith SM, Min J, Ganesh T, Diebold B, Kawahara T, y cols.,. 2012. Ebselen and congeners inhibit NADPH oxidase 2-dependent superoxide generation by interrupting the binding of regulatory subunits. *Chem Biol* **19**:752-63
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* **32**:638-47
- Sofroniew MV y Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**:7-35
- Sohal RS, Mockett RJ y Orr WC. 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* **33**:575-86
- Spat A, Fulop L, Koncz P y Szanda G. 2009. When is high-Ca⁺ microdomain required for mitochondrial Ca⁺ uptake? *Acta Physiol (Oxf)* **195**:139-47
- Spencer JP. 2008. Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proc Nutr Soc* **67**:238-52
- Stadtman ER. 1992. Protein oxidation and aging. *Science* **257**:1220-4
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, y cols.,. 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* **30**:243-7
- Sternweis PC y Smrcka AV. 1992. Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci* **17**:502-6
- Strehler EE y Zacharias DA. 2001. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* **81**:21-50
- Sudan S y Rupasinghe HP. 2014. Quercetin-3-O-glucoside induces human DNA topoisomerase II inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Res* **34**:1691-9
- Sun GY, Xu J, Jensen MD y Simonyi A. 2004. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* **45**:205-13
- Sun Y, Yang T y Xu Z. 2007. The JNK pathway and neuronal migration. *J Genet Genomics* **34**:957-65
- Surroca A y Wolff D. 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate but not ryanodine-receptor agonists induces calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles. *J Membr Biol* **177**:243-9
- Sutton R, Petersen OH y Pandol SJ. 2008. Pancreatitis and calcium signalling: report of an international workshop. *Pancreas* **36**:e1-14

Bibliografía

- Suzuki H, Suematsu M, Miura S, Asako H, Kurose I, y cols.,. 1993. Xanthine oxidase-mediated intracellular oxidative stress in response to cerulein in rat pancreatic acinar cells. *Pancreas* **8**:465-70
- Svichar N, Esquenazi S, Waheed A, Sly WS y Chesler M. 2006. Functional demonstration of surface carbonic anhydrase IV activity on rat astrocytes. *Glia* **53**:241-7
- Tabernerero A, Medina JM y Giaume C. 2006. Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J Neurochem* **99**:1049-61
- Tak JK y Park JW. 2009. The use of ebselen for radioprotection in cultured cells and mice. *Free Radic Biol Med* **46**:1177-85
- Tan D-X, Chen L, Poeggeler B, Manchester L y Reiter R. 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr j* **1**:57-60
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M y Calvo JR. 2000. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* **9**:137-59
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, y cols.,. 1999. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* **1472**:206-14
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ y Reiter RJ. 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* **42**:28-42
- Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shinagawa R y Kagamiishi Y. 2006. [S100B: astrocyte specific protein]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* **26**:11-6
- Taupin P. 2007. *The hippocampus : neurotransmission and plasticity in the nervous system*. New York: Nova Biomedical Books. 144 p. pp.
- Taylor CW y Laude AJ. 2002. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium* **32**:321-34
- Taylor CW y Richardson A. 1991. Structure and function of inositol trisphosphate receptors. *Pharmacol Ther* **51**:97-137
- Tepikin AV, Voronina SG, Gallacher DV y Petersen OH. 1992. Acetylcholine-evoked increase in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration and Ca²⁺ extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **267**:3569-72
- Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, y cols.,. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* **27**:17-23
- Thomas DD, Weng N y Groblewski GE. 2004. Secretagogue-induced translocation of CRHSP-28 within an early apical endosomal compartment in acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G253-63
- Tinel H, Cancela JM, Mogami H, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, y cols.,. 1999. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *EMBO J* **18**:4999-5008
- Toker A y Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**:673-6
- Tripathi DN y Jena GB. 2008. Ebselen attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage in mice. *Free Radic Res* **42**:966-77

- Trivedi AK y Kumar V. 2014. Melatonin: an internal signal for daily and seasonal timing. *Indian J Exp Biol* **52**:425-37
- Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S y Di Primio R. 2005. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J Pineal Res* **39**:425-31
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K y Fox A. 1995. Reflections on Ca(2+)-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* **18**:52-4
- Tsujimoto Y y Shimizu S. 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* **12**:835-40
- Tsunoda Y, Stuenkel EL y Williams JA. 1990. Characterization of sustained [Ca²⁺]_i increase in pancreatic acinar cells and its relation to amylase secretion. *Am J Physiol* **259**:G792-801
- Tu P, Kunert-Keil C, Lucke S, Brinkmeier H y Bouron A. 2009. Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J Neurochem* **108**:126-38
- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**:335-44
- Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, y cols.,. 2012. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* **53**:91-8
- Ulrich CD, 2nd, Wood P, Hadac EM, Kopras E, Whitcomb DC y Miller LJ. 1998. Cellular distribution of secretin receptor expression in rat pancreas. *Am J Physiol* **275**:G1437-44
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, y cols.,. 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **27**:838-47
- Usborne AL, Smith AT, Engle SK, Watson DE, Sullivan JM y Walgren JL. 2014. Biomarkers of exocrine pancreatic injury in 2 rat acute pancreatitis models. *Toxicol Pathol* **42**:195-203
- Vallerie SN y Hotamisligil GS. 2010. The role of JNK proteins in metabolism. *Sci Transl Med* **2**:60rv5
- Vandewalle G, Maquet P y Dijk DJ. 2009. Light as a modulator of cognitive brain function. *Trends Cogn Sci* **13**:429-38
- Verkhatsky A y Butt A. 2007. *Glial neurobiology : a textbook*. Chichester, England a; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xiv, 215 p. pp.
- Verkhatsky A, Orkand RK y Kettenmann H. 1998. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* **78**:99-141
- Vijayalaxmi, Reiter RJ y Meltz ML. 1995. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat Res* **346**:23-31
- Walsh C, Barrow S, Voronina S, Chvanov M, Petersen OH y Tepikin A. 2009. Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1787**:1374-82
- Walsh DA y Van Patten SM. 1994. Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J* **8**:1227-36
- Walther M, Holzthutter HG, Kuban RJ, Wiesner R, Rathmann J y Kuhn H. 1999. The inhibition of mammalian 15-lipoxygenases by the anti-inflammatory drug ebselen: dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *Mol Pharmacol* **56**:196-203

Bibliografía

- Wallenberg M, Olm E, Hebert C, Bjornstedt M y Fernandes AP. 2010. Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. *Biochem J* **429**:85-93
- Wang H, Hu Y y Tsien JZ. 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* **79**:123-35
- Wang X, Takano T y Nedergaard M. 2009. Astrocytic calcium signaling: mechanism and implications for functional brain imaging. *Methods Mol Biol* **489**:93-109
- Ward JB, Sutton R, Jenkins SA y Petersen OH. 1996. Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* **111**:481-91
- Weber H, Huhns S, Luthen F y Jonas L. 2009. Calpain-mediated breakdown of cytoskeletal proteins contributes to cholecystokinin-induced damage of rat pancreatic acini. *Int J Exp Pathol* **90**:387-99
- Wei L, Zhang Y, Yang C, Wang Q, Zhuang Z y Sun Z. 2014. Neuroprotective effects of ebselen in traumatic brain injury model: involvement of nitric oxide and p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **41**:134-8
- Wilson BA, Wang H, Nacev BA, Mease RC, Liu JO, y cols.,. 2011. High-throughput screen identifies novel inhibitors of cancer biomarker alpha-methylacyl coenzyme A racemase (AMACR/P504S). *Mol Cancer Ther* **10**:825-38
- Willard SS y Koochekpour S. 2013. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci* **9**:948-59
- Williams JA. 2006. Regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterol* **22**:498-504
- Williams JA. 2010. Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol* **26**:478-83
- Withyachumnarnkul B, Limpanawattanakul M y Trakulrungsi W. 1986. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration. *Life Sci* **38**:1757-65
- Wolfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K y Liebmann PM. 2001. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Lett* **502**:127-31
- Xia R, Ganther HE, Egge A y Abramson JJ. 2004. Selenium compounds modulate the calcium release channel/ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle by oxidizing functional thiols. *Biochem Pharmacol* **67**:2071-9
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, y cols.,. 2001. Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* **74**:408-13
- Yago MD, Manas M, Ember Z y Singh J. 2001. Nitric oxide and the pancreas: morphological base and role in the control of the exocrine pancreatic secretion. *Mol Cell Biochem* **219**:107-20
- Yamagata K, Ichinose S, Miyashita A y Tagami M. 2008. Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience* **153**:428-35

- Yamashima T. 2004. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* **36**:285-93
- Yamashita N, Murata M, Inoue S, Burkitt MJ, Milne L y Kawanishi S. 1998. Alpha-tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions. *Chem Res Toxicol* **11**:855-62
- Yamauchi T. 2005. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull* **28**:1342-54
- Yang CF, Shen HM y Ong CN. 1999. Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* **57**:273-9
- Yang CF, Shen HM y Ong CN. 2000a. Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch Biochem Biophys* **374**:142-52
- Yang CF, Shen HM y Ong CN. 2000b. Intracellular thiol depletion causes mitochondrial permeability transition in ebselen-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **380**:319-30
- Yonezawa S, Higashi M, Yamada N y Goto M. 2008. Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver* **2**:137-54
- Yoshida H, Tsunoda Y y Owyang C. 1997. Effect of uncoupling NO/cGMP pathways on carbachol- and CCK-stimulated Ca²⁺ entry and amylase secretion from the rat pancreas. *Pflugers Arch* **434**:25-37
- Yoshizumi M, Fujita Y, Izawa Y, Suzaki Y, Kyaw M, y cols.,. 2004. Ebselen inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced c-Jun N-terminal kinase activation and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Exp Cell Res* **292**:1-10
- Young KW y Nahorski SR. 2002. Sphingosine 1-phosphate: a Ca²⁺ release mediator in the balance. *Cell Calcium* **32**:335-41
- Yu JH, Kim H y Kim KH. 2003. Calcium-dependent apoptotic gene expression in cerulein-treated AR42J cells. *Ann N Y Acad Sci* **1010**:66-9
- Yue WY, Clark JJ, Fernando A, Domann F y Hansen MR. 2011. Contribution of persistent C-Jun N-terminal kinase activity to the survival of human vestibular schwannoma cells by suppression of accumulation of mitochondrial superoxides. *Neuro Oncol* **13**:961-73
- Yule DI. 2010. Pancreatic acinar cells: molecular insight from studies of signal-transduction using transgenic animals. *Int J Biochem Cell Biol* **42**:1757-61
- Zebisch A, Czernilofsky AP, Keri G, Smigelskaite J, Sill H y Troppmair J. 2007. Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside. *Curr Med Chem* **14**:601-23
- Zhang L, Zhou L, Du J, Li M, Qian C, y cols.,. 2014. Induction of apoptosis in human multiple myeloma cell lines by ebselen via enhancing the endogenous reactive oxygen species production. *Biomed Res Int* **2014**:696107
- Zhang W, Fei Z, Zhen HN, Zhang JN y Zhang X. 2007. Resveratrol inhibits cell growth and induces apoptosis of rat C6 glioma cells. *J Neurooncol* **81**:231-40
- Zhao R y Holmgren A. 2004. Ebselen is a dehydroascorbate reductase mimic, facilitating the recycling of ascorbate via mammalian thioredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* **6**:99-104
- Zhao R, Masayasu H y Holmgren A. 2002. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:8579-84

Bibliografía

Zhao X, Chabes A, Domkin V, Thelander L y Rothstein R. 2001. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J* **20**:3544-53

FUENTES DE LA IMÁGENES USADAS

Figura 1. <http://www.sciencephoto.com/media/306985/view> 01/08/2014

Figura 2. Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria de Cáceres.

Figura 3. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/blood-brain+barrier> 05/08/2014

Figura 4. Belanger M, Allaman I y Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* **14**:724-38

Figura 5. <http://sheerazgul.wordpress.com/2013/12/27/expected-ospe-slides-for-pharmacology/> 07/08/2014

Figura 6. Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**, 897-909, (2002).

Figura 7. Cooper, G. M. The cell: a molecular approach. (ASM Press, 2000).

Figura 8. <http://www.sciencephoto.com/media/310386/view> 20/08/2014

Figura 9. Franzini-Armstrong, C. ER-mitochondria communication. How privileged? *Physiology (Bethesda)* **22**, 261-268, (2007).

Figura 10. Dufresne, M., Seva, C. & Fourmy, D. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev* **86**, 805-847, (2006).

Figura 11. Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria de Cáceres.

Figura 12. Ellis C. (2004). "The state of GPCR research in 2004." *Nat Rev Drug Discov* **3**(7): 575, 577-626.

Figura 13. http://en.wikipedia.org/wiki/Mitogen-activated_protein_kinase

Figura 14. Scharenberg, A. M., Humphries, L. A. & Rawlings, D. J. (2007) "Calcium signalling and cell-fate choice in B cells". *Nat Rev Immunol* **7**, 778-789.

Figura 15. [http://aragec.com/gsh.html#prettyPhoto\[galeri\]/2/](http://aragec.com/gsh.html#prettyPhoto[galeri]/2/) 24/11/2014

Figura 16. <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/70530>

Figura 17. <https://todosigueigual.files.wordpress.com/2013/11/biosintesis-melatonina.png> 20/08/2014