



**Departamento de Fisiología**

**PAPEL ETIOPATOGÉNICO DEL TABACO Y EL  
ALCOHOL EN LOS PROCESOS DE FIBROGÉNESIS  
PANCREÁTICA ASOCIADO A PANCREATITIS  
CRÓNICA:  
ESTUDIO SOBRE CULTIVO DE CÉLULAS ESTRELLADAS  
PANCREÁTICAS**

Margarita de Montserrat Castiñeira Alvariño

Santiago de Compostela, 2014





D. J. Enrique Domínguez Muñoz, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe de Servicio del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral presentada por Margarita de Montserrat Castiñeira Alvariño, que lleva por título: **“Papel etiopatogénico del tabaco y el alcohol en los procesos de fibrogénesis pancreática asociado a pancreatitis crónica: estudio sobre cultivo de células estrelladas pancreáticas”** ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Gastroenterología en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en Biología.

Revisado el mismo, queda conforme con su presentación para ser juzgado como Tesis Doctoral por el correspondiente tribunal.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado

Fdo: Prof. J. Enrique Domínguez Muñoz





Dña. María Pardo Pérez, Investigadora del SNS Miguel Servet (ISCIII/ SERGAS) e IP del grupo Obesidómica (IDIS)

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral presentada por Margarita de Montserrat Castiñeira Alvariño, que lleva por título: **“Papel etiopatogénico del tabaco y el alcohol en los procesos de fibrogénesis pancreática asociado a pancreatitis crónica: estudio sobre cultivo de células estrelladas pancreáticas”** ha sido realizada bajo su tutoría en el Laboratorio de Gastroenterología en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en Biología.

Revisado el mismo, queda conforme con su presentación para ser juzgado como Tesis Doctoral por el correspondiente tribunal.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado

Fdo: Dr. María Pardo Pérez



Este trabajo ha sido realizado con cargo a Proyectos de Investigación Subvencionados por el Fondo de Investigación Sanitaria (ISCIII-FIS PI10/01983) y por la Fundación Mutua Madrileña (MMA 2010).



## *Agradecimientos*



Durante estos 5 años han sido muchas las personas que me han ayudado y apoyado no sólo a nivel laboral, sino también personal. Espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar agradecer al jefe, el Dr. Enrique Domínguez Muñoz, la oportunidad de hacer la tesis en su grupo. Gracias a ese momento en que me dijo, “vente que te enseñe el laboratorio” he llegado aquí. Como dijo B Franklin “Dime y lo olvido/ enséñame y lo recuerdo/ involúcrame y lo aprendo”. Muchas gracias por involucrarme.

En segundo lugar a mi tutora, María Pardo. No sólo por ayudarme, enseñarme y darme todas las herramientas necesarias para hacer los mejores *western blot*, sino porque me has enseñado el verdadero dogma de la biología molecular “los experimentos saben tu estado de ánimo. Como creas que van a salir mal, salen mal”. Muchas gracias por estar ahí, corregirme y darme un millón de ideas.

También a todos los que forman o han formado parte de FIENAD y del servicio de digestivo, Laura, Marta, Rocío, Paula, Manu, Fer, Julio, Lari y los resis (Nico, Dani, Laura e Iria) las reuniones de los martes son más llevaderas con vosotros. Laura, Marta y Rocío, mil gracias por los momentos de desestrés y más ahora que Roci está con nosotras en la -2. A ti Paula, agradecerte tus correcciones de forma y estilo, y tu apoyo en numerosas ocasiones. A Julio que intenta “hacernos creer” a los que no sabemos nada de endoscopias, que esos videos y fotos son algo real. A Lari por tu enorme apoyo en los congresos, ir a la EPC sin ti, no sería lo mismo.

A todos mis compañeros de los laboratorios del IDIS, especialmente a los de la sala de cultivos, los cardios y los oncos y a los endocrinólogos. Porque de cada uno de vosotros he aprendido algo nuevo. Primero, a Bruno y Toño, porque fuisteis mis primeros profes en el cultivo de células, y porque vuestra espontaneidad es contagiosa. A Ángel y Sonia por ayudarme con las inmunos, sin vuestra ayuda no lo hubiese conseguido. A Laura, Jorge, Javi y Alex porque siempre que he tenido una duda, problema o cualquier duda existencial estabais para responderme. A Marta, porque tienes una fortaleza envidiable. Y a Lore, porque eres realmente genial y junto con Ángel cuidasteis de las celulillas en mi ausencia. A todos los endocrinos, Ceci, Silvia, Cintia, Turo, Lucia, María y Sisi, porque los westerns no sería lo mismo sin vosotros. También a Carlos por sus chistes diarios.

A Patri de anatomía patológica, porque eres un genio de las tinciones y a Anxo Vidal, por permitirme usar el citómetro siempre que lo he necesitado.

A las que compartís conmigo el viaje eterno del tren, Ana y Ariana, las mañanas son más llevaderas con vosotras (aunque sólo quedemos dos). Ana, gracias por tus cafés en la playa de Compostela, has sido una verdadera amiga y Ari, te tengo que agradecer tu inestimable ayuda con el citómetro, ¡me sigue pareciendo hipercomplicado! En este tiempo te has convertido no solo en una compañera sino también en una amiga, se que podré contar contigo y eres un ejemplo para mí de fuerza y nobleza.

A María, mi compañera y amiga. Hemos “crecido” juntas en esto de la investigación (tu siempre un poquito por delante, cosa que me ha dado ventaja). Muchas gracias por todos esos momentos que me han hecho crecer no solo a nivel profesional sino también personal. Gracias por tu apoyo, por lo cafés de los lunes y las cañas de los viernes (en nuestra pontevedriña), y sobre todo gracias por tu variable gusto musical, nunca pensé que podría escuchar en una misma lista de reproducción a Rocío Jurado y Alaska, pasando claro está por Mocedades y Love of Lesbian.

A los chicos de la facultad, Fon, Noe, Antonio, Anita, Ere, Pablo y Ate. Gracias a ese momento en Praga, en el que me animasteis a seguir la carrera en Santiago, estoy aquí. Noe y Anita porque aunque estéis lejos, las nuevas tecnologías nos hacen estar cerca. A Antonio, porque realmente eres alguien especial, y me alucina que tengas tanto empuje y seas capaz de trasmitirlo a quién esté a tu lado. A Pablo porque nos has hecho ver que los sueños se cumplen. A Ere y Ate, “las mejores” porque sois un ejemplo de que amistad, trabajo y convivencia es posible. A Fon, porque me has ayudado a superar muchos baches, has estado presente en momentos muy importantes de mi vida, y me has dado los empujones justos para que el seguir adelante fuera más llevadero. Muchas gracias por esta ahí siempre

A mis amigas, a todas vosotras, Carlotiña, Tanica, Emma, Leti y Patri. He crecido con vosotros, me habéis ayudado y apoyado. Gracias por obligarme a tomarme las cosas con calma y por supuesto gracias por vuestra alegría porque siempre os he sentido cerca. Y Tani, gracias por hacerme el mejor regalo ¡tengo el ahijado más guapo del mundo! A Palomita, porque has cumplido tus sueños por encima de todo. También a “las Faraonas”, Lore, Shaila, Fer y Rupor hacerme reír tantísimo y

ayudarme siempre. Y Fer por sus múltiples diseños, se que hubo momentos en que querías matarme. También quiero agradecer a Ger su ayuda en el mundo de la biología en general.

Gracias a mis tías, Ana, Paz, Carmen y Pepa. Porque siempre estáis pendientes de todos nosotros, y os habéis preocupado por mí en más de una ocasión, aunque mis contestaciones no fuesen del todo correctas.

A mis hermanos, Ana y Jose, porque habéis sido mis primeros amigos y mis primeros enemigos, y aunque ahora "*non somos os mesmos*" me apoyáis cada día. Las historias y problemas que nos contábamos los tres metidos en una cama de 80 han cambiado (así terminó convertida en tres tablas), pero lo que nunca cambia son vuestras palabras de ánimo.

A Rober, porque eres un ayuda fundamental, porque cada día que pasa espero ese mensaje de ánimo mañanero. Gracias por aguantar mis agobios y gracias por quererme tanto.

A mis padres. Vosotros me habéis inculcado el interés por las ciencias, me habéis apoyado y escuchado y no sólo durante estos últimos 5 años. Todos y cada uno de esos pequeños gestos, las notas escondidas en la taza del desayuno, una comida especial, un "sé feliz" desde la puerta, una llamada a deshora sólo para saludar...me han dado ganas de repetir y repetir los experimentos que se resistían. Todo lo que soy os lo debo a vosotros. Aunque pasen los años, seguís cuidándome y protegiéndome. Habéis pasado la tesis conmigo y también es vuestra. Para mí sois un ejemplo a seguir. Os quiero.

A Paquita por tu ¡Nena, tú pisa fuerte! porque siempre lo llevo conmigo.



## *Tabla de contenidos*



# Tabla de Contenidos

---

<b>ACRÓNIMOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>PATOLOGÍA PANCREÁTICA: LA PANCREATITIS CRÓNICA.....</b>	<b>9</b>
<b>1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS .....</b>	<b>10</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PANCREATITIS CRÓNICA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO .....</b>	<b>14</b>
3.1. TÓXICO-METABÓLICOS .....	14
3.1.1. TÓXICOS .....	14
3.1.2. METABÓLICOS .....	15
3.2. IDIOPÁTICOS.....	15
3.3. GENÉTICOS.....	16
3.4. AUTOINMUNES.....	17
3.5. PANCREATITIS AGUDA RECURRENTE Y GRAVE .....	17
3.6. OBSTRUCTIVOS .....	17
<b>4. HISTORIA NATURAL DE LA PANCREATITIS CRÓNICA .....</b>	<b>18</b>
<b>5. MECANISMOS PATOGENÉTICOS .....</b>	<b>19</b>
<b>6. LA FIBROSIS PANCREÁTICA COMO CARACTERÍSTICA DE LA PANCREATITIS CRÓNICA</b>	
<b>21</b>	
6.1. LA MATRIZ EXTRACELULAR .....	22
6.1.1. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES: EL COLÁGENO .....	23
6.1.2. PROTEÍNAS DE ADHESIÓN: LA FIBRONECTINA.....	24
6.2. MECANISMOS MOLECULARES .....	25
6.3. DISTRIBUCIÓN DE LA FIBROSIS DEPENDIENDO DE LA ETIOLOGÍA .....	26
<b>7. LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS.....</b>	<b>28</b>
7.1. BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	28
7.2. EL ORIGEN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	29
7.3. PAPEL DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS COMO INDUCTORAS DE FIBROSIS .....	30
7.4. ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	32
7.5. FACTORES DE ACTIVACIÓN EN LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	35
7.6. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS. ....	38
7.7. EL PROCESO INFLAMATORIO : LA FRACTALQUINA (CX3CL1).....	40
7.8. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS.....	41
7.9. INTERACCIONES CON OTROS TIPOS CELULARES.....	44
7.9.1. INTERACCIONES CON CÉLULAS CANCERÍGENAS .....	44

<b>8. EL PAPEL DE LOS TÓXICOS EN EL PÁNCREAS .....</b>	<b>46</b>
8.1. EL ALCOHOL.....	46
8.1.1. EL ALCOHOL EN LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	48
8.2. EL TABACO.....	50
8.2.1. EL TABACO Y LA FIBROGÉNESIS .....	52
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>55</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	65
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	65
3. TRATAMIENTOS .....	66
3.1. EL ALCOHOL .....	66
3.2. EL TABACO .....	66
4. AISLAMIENTO CELULAR .....	67
4.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS .....	69
5. TIPOS DE CULTIVO .....	70
5.1. CULTIVO PRIMARIO.....	70
5.2. CULTIVO TEMPRANO.....	71
6. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	72
6.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS, VIABILIDAD Y PUREZA DEL CULTIVO..	72
7. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD CELULAR.....	73
7.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) .....	73
8. PROLIFERACIÓN .....	75
8.1. ENSAYO DE TETRAZOLIUM SOLUBLE EN AGUA ( <i>WATER-SOLUBLE TETRAZOLIUM 1</i> , WST-1).....	75
8.2. SISTEMA XCELLIGENCE .....	76
9. MIGRACIÓN CELULAR .....	78
9.1. <i>WOUND HEALING ASSAY</i> (WHA).....	78
9.2. <i>TRANSWELL® MIGRATION ASSAY</i> (TMA) .....	80
10. ANÁLISIS DE PROTEÍNA .....	83
10.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS PARA ESTUDIOS DE ACTIVACIÓN Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR .....	83
10.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS .....	85
10.3. CUANTIFICACIÓN DE LA MUESTRA .....	86
10.4. INMUNODETECCIÓN MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i> .....	87
10.5. INMUNOCITOQUÍMICA .....	93
10.6. TINCIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON .....	95
10.7. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA) PARA FRACTALQUINA.....	97

11. ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO .....	98
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	100
13. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	101
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>103</b>
1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ESTRELLADAS PROVENIENTE DE PÁNCREAS DE RATA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO.....	105
2. EFECTO DEL TABACO SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS.....	107
2.1. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD CELULAR .....	107
2.2. ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN .....	113
3. TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS COMO MARCADOR DEL INICIO DEL PROCESO DE ACTIVACIÓN CELULAR. ....	119
4. MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS COMO UN PROCESO FUNDAMENTAL EN LA FIBROGÉNESIS PANCREÁTICA. ....	121
4.1. MIGRACIÓN MEDIANTE ENSAYO DE CICATRIZACIÓN: <i>WOUND HEALING ASSAY</i> (WHA) .....	121
4.2. MIGRACIÓN: <i>TRANSWELL® MIGRATION ASSAY</i> .....	123
5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR COMO MARCADORES DEL DESARROLLO DE FIBROSIS. ....	124
5.1. EXPRESIÓN DE COLÁGENO TIPO 1 .....	125
5.2. EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA-1 .....	129
6. LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS INFLAMATORIAS E INDUCTORAS DE FIBROSIS.....	135
6.1. EXPRESIÓN DE FRACTALQUINA MEDIANTE ELISA .....	135
7. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO COMO EFECTORES DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS PANCREÁTICAS. ....	136
7.1. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) .....	136
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>139</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>157</b>
<b>8. LÍNEAS FUTURAS DE TRABAJO .....</b>	<b>161</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>165</b>



*Acrónimos*



# Acrónimos

---

<b><math>\alpha</math>7nAChR</b>	Receptor $\alpha$ 7 nicotin-acetilcolina
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina $\alpha$ de músculo liso
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AP-1</b>	<i>Activator Protein 1</i>
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNmi</b>	Micro ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín- Trifosfato
<b>BSA</b>	Suero de albumina bovino
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CFTR</b>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator</i>
<b>CI</b>	<i>Cell Index</i>
<b>Col.I</b>	Colágeno tipo I
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CP</b>	Cáncer de páncreas
<b>CSC</b>	<i>Cigarette smoke condensate</i>
<b>CTGF</b>	Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
<b>CX3CL1(FKN)</b>	Fractalquina
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P450E1
<b>DBTC</b>	Dicloro- Dibutil Estaño
<b>DCF-DA</b>	2'-7' Diclorofluoresceína diacetato
<b>DEN</b>	N-Nitrosonordietilamina
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EDTA</b>	Etilendiamina-ácido tretraacético
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo enzimático

<b>EMT</b>	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
<b>ERK</b>	Quinasa Regulada por señales Extracelulares
<b>FAEE</b>	Etil esteres de ácidos grasos
<b>FNT-1</b>	Fibronectina-1
<b>FSC</b>	<i>Forward light scatter</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	Proteína Fibrilar Glial Ácida
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HEPES</b>	Ácido N-(2-hidroietil) piperazin-N´-(2-etanosulfónico)
<b>HSC</b>	Células Estrelladas Hepáticas
<b>ICAM-1</b>	Molécula de Adhesión Intercelular 1
<b>ICQ</b>	Inmunocitoquímica
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IPE</b>	Insuficiencia Pancreática Exocrina
<b>JAK/STAT</b>	<i>Jun N-terminal Kinase or Stress-Activated Protein Kinase</i>
<b>JNK</b>	Jun N-terminal Quinasa
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos de Pared Bacteriana
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de Monocitos
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinasa 2 (Gelatinasa A)
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinasa 9(Gelatinasa B)
<b>NAD</b>	Nicotinamido-adenín-dinucleótido, forma oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamido-adenín-dinucleótido, forma reducida
<b>NADPH</b>	Nicotinamido-adenín-dinucleótido fosforilado, forma reducida

<b>NFκB</b>	Factor de transcripción potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
<b>NK</b>	<i>Natural Killers</i>
<b>NNK</b>	N-nitrosaminas(4-metilnitrosamina-1-3-piridil-1-butanona)
<b>NNN</b>	N-Nitrosornicotina
<b>O<sup>2-</sup></b>	Radical anión superóxido
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PA</b>	Pancreatitis Aguda
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	Tampón Fosfato Salino con <i>Tween-20</i>
<b>PC</b>	Pancreatitis Crónica
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento derivado de plaquetas
<b>PRSS1</b>	Gen del tripsinógeno catiónico
<b>PSC</b>	Células Estrelladas Pancreáticas
<b>RANTES</b>	Regulador de la Activación de las Células T normalmente secretadas y expresadas
<b>ROCK</b>	Rho-Rho quinasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RTCA</b>	<i>Real Time Cell Analyzer</i>
<b>SAPE</b>	Sentinel Acute Pancreatitis Event
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SPINK 1</b>	Serin Protease inhibitor Kazal-type1
<b>SSC</b>	<i>Side light scatter</i>
<b>TBS-T</b>	Tampón Tris Salino con <i>Tween-20</i>
<b>TGFβ</b>	Factor de Crecimiento transformanteβ
<b>TIMPs</b>	Inhibidor Tisular de metaloproteinasa
<b>TLR</b>	Receptor <i>Toll-Like</i>
<b>TMA</b>	<i>Transwell® Migration Assay</i>
<b>TNBS</b>	2,4,6-trinitrobenceno sulfónico
<b>TNFα</b>	Factor de Necrosis Tumoral α

<b>TPM</b>	<i>Total particulate matter</i>
<b>UBE</b>	Unidad de bebida estándar
<b>UPR</b>	<i>Unfolded Protein Response</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i>
<b>WHA</b>	<i>Wound Healing Assay</i>
<b>WST-1</b>	<i>Water-Soluble tetrazolium 1</i>

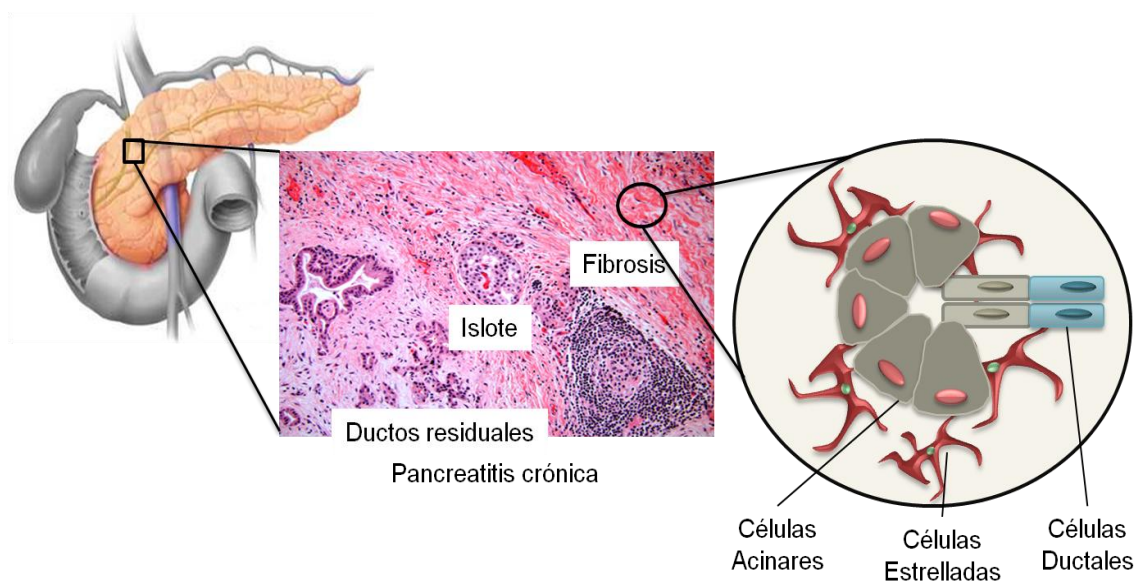
# *1. Introducción*



# Introducción

## Patología pancreática: La pancreatitis crónica

La pancreatitis crónica (PC) es un proceso inflamatorio crónico del páncreas caracterizado por una progresiva destrucción del parénquima pancreático que es sustituido por tejido fibroso(1). Aunque clásicamente se consideraba una entidad de carácter irreversible, hoy en día se sabe que en determinados casos con un tratamiento adecuado es posible la reversibilidad de la enfermedad(2). La primera fase de la enfermedad cursa predominantemente con cuadros de dolor, mientras que en fases tardías se caracterizan por insuficiencia pancreática exocrina que conduce a malabsorción y malnutrición, diabetes mellitus secundaria a la PC, pseudoquistes, estenosis ductal y duodenal y trombosis vascular. La aparición de estas complicaciones y otras, como degeneración neoplásica en las últimas fases de la enfermedad, la convierten en una enfermedad con un grave impacto sobre la calidad de vida de los pacientes(3).



**Figura 1. Esquema representativo de los componentes del páncreas exocrino.** Modificado de Omary y colaboradores, 2007 (4).

## 1. Antecedentes Históricos

El páncreas debido a su localización retroperitoneal y en íntima relación con órganos vecinos, como el estómago, el duodeno o el bazo, es un órgano de difícil acceso quirúrgico y de gran importancia clínica. Fue Herófilo (335-280 aC.), un anatomista griego, el primero en hacer una descripción del páncreas. Unos 400 años después de Herófilo, a mediados del siglo 2 dC. Rufo de Éfeso (100 dC.), un famoso anatomista y cirujano, conocido por su tratado de nomenclatura anatómica, nombró al órgano como "páncreas" y lo diferenció de los nódulos linfáticos mesentéricos. En griego, la palabra *παγκρεας* (páncreas) está compuesto por *παν* (pan-), "todo", y por *κρεας* (-creas), "carne". Esta palabra ya había sido utilizada por Hipócrates, sin embargo, se utilizaba para designar a todas las glándulas del cuerpo(5). Hacia mediados del s. XVIII, Wirsung define el conducto pancreático principal que lleva su nombre y, posteriormente, Reigner de Graaf descubre la secreción pancreática. Sin embargo, fue Claude Bernard quién identificó la función exocrina del páncreas demostrando que el jugo pancreático juega un papel fundamental durante la digestión(6). La primera descripción histológica del páncreas la realizó Paul Langerhans en 1893(7), concretamente, describe 9 tipos celulares a lo largo de la glándula sin llegar a formular una hipótesis sobre la naturaleza de las mismas. En 1893, el histólogo francés GE Laguesse los denominó "ilots de Langerhans".

En lo que concierne a las enfermedades inflamatorias del páncreas, antiguamente se denominaban "cirrosis", término introducido por Galeno, aunque este término no era específico de una enfermedad sino que hacía referencia a un amplio abanico de enfermedades. Los primeros casos de necrosis pancreática fueron descritos por Aubert (1578-1579) y posteriormente Morgani, en 1761, describe el primer pseudoquistes pancreático(6). Ya entrado el siglo XIX, Carl von Rokitansky (1865), publica un trabajo sobre los hallazgos anatómicos propios de la pancreatitis necrohemorrágica y realizó una clasificación de la pancreatitis en hemorrágica y supurada. A continuación, N. Friedreich, en 1878, realizó la primera descripción anatómica de lo que hoy se conoce como pancreatitis crónica y define el papel del alcohol en la pancreatitis proponiendo el término de "páncreas alcohólico"(8). El 21 de febrero de 1889, un patólogo de la universidad de Harvard,

Reginald H. Fitz, publicó en el *Boston Medical and Surgical Journal*, un artículo donde explicaba los cambios clínicos y anatomopatológicos de los enfermos fallecidos de pancreatitis aguda grave, añadiendo a la clasificación de Rokitansky, la forma gangrenosa y la diseminación de la necrosis adiposa(9). Unos años más tarde, en 1896, Hans Chiari formuló la teoría enzimática de la patogenia de esta enfermedad(10). No fue hasta el año 1912, cuando W. Kausck realizó la primera duodenopancreatectomía cefálica para el tratamiento del cáncer de páncreas, abriendo la puerta al tratamiento quirúrgico en la patología pancreática.

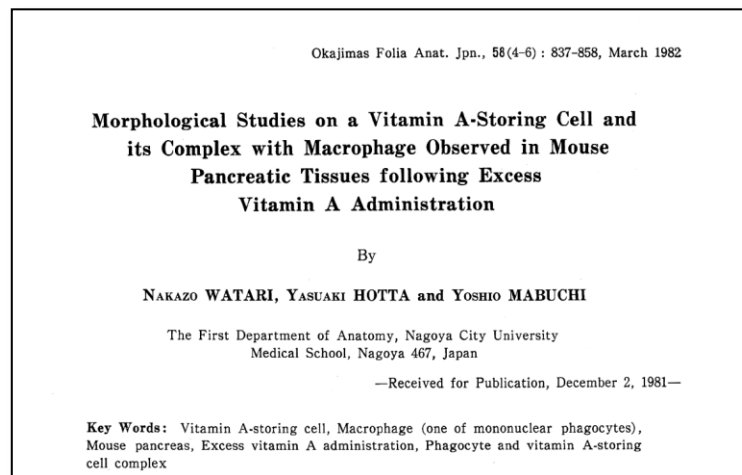
A mediados de los años 50, aparecen las primeras clasificaciones de pancreatitis basadas principalmente en factores morfológicos. En 1963, el simposio de Marsella y posteriormente en Cambridge (1983), Marsella (1984) y Atlanta (1992), definen diferentes tipos de pancreatitis, sus manifestaciones clínicas, la gravedad del proceso y el tipo de complicaciones, de forma que se consigue una mayor eficacia en el diagnóstico y el tratamiento de la patología pancreática(11).

Con la identificación de criterios clínicos y analíticos se ha podido predecir, desde fases iniciales, la evolución de la enfermedad en fases agudas. Pero ha sido gracias a la mejora de las técnicas de imagen, cuando se consiguió llevar a cabo el diagnóstico precoz en formas menos graves de pancreatitis aguda y poder conocer posibles complicaciones que puedan aparecer a lo largo de la evolución de la enfermedad. Con la aparición de nuevas técnicas en biología molecular se han desarrollado diferentes modelos experimentales que han permitido iniciar el estudio de los mecanismos intracelulares del proceso fisiopatológico. Es a partir de 1952 cuando Comfort y colaboradores hablaron por primera vez de la posible predisposición genética a la pancreatitis crónica(12), y se iniciaron los estudios sobre la bases genéticas de la enfermedad(13).

El estudio de la fibrosis pancreática a diferencia de la hepática, es relativamente nueva, y se basa en estudios previos de la fibrosis en el hígado. Fue el patólogo Karl Wilhelm von Kupffer hace más de 130 años, donde en una carta a un colega, Heinrich von Waldeyer, describe unas células con forma de estrella, "sternezellen", que aparecían en espacios peri-sinusoidales en el hígado al tñirlas con cloruro de oro(14). Sin embargo, Kupffer no podía asegurar que estas células tuviesen un origen diferente a los macrófagos del hígado. Unos 75 años después, Ito hizo

referencia a unas células que contenían lípidos en su interior y con localización perisinusoidal a las que denominó células de Ito. Finalmente en 1971, Wake y colaboradores, demostraron que las células estrelladas hepáticas poseían gránulos de vitamina A en su interior y que eran las mismas células que las que describieron Kupffer y posteriormente Ito(14,4).

En cuanto al estudio de la fibrosis pancreática, fue en 1982 cuando Nakazo Watari y colaboradores (Figura 2)(15) estudiaron páncreas de ratón mediante fluorescencia, y observaron que existían numerosos gránulos de vitamina A concentrados en áreas periacinares. En 1990, Ikejiri encontró una fluorescencia similar en el páncreas de rata y en el humano(4).



**Figura 2. Artículo escrito por Watari N en 1982.** Publicado en Okajimas Folia Anatomica Japonica, donde describe por primera vez las células estrelladas pancreáticas.

En el año 1997, Saotome y colaboradores describieron el aislamiento de células periacinares con forma similar a un fibroblasto de páncreas humano(16). Finalmente un año después, aparecen dos publicaciones donde describen un método de aislamiento y cultivo de las células estrelladas de páncreas de rata y humano(17,18). A partir de ese momento han surgido numerosos estudios centrados en conocer la fisiología de dichas células. En el año 2010 tras el análisis del transcriptoma de células estrelladas pancreáticas y hepáticas (un total de 23.000 genes) se puso de manifiesto que sólo 29 genes difieren en la expresión en ambos tipos celulares(19). Estos métodos de estudio han proporcionado las

herramientas necesarias y fundamentales para el estudio de las células estrelladas pancreáticas y su relación con la fibrosis pancreática.

## 2. Epidemiología de la Pancreatitis Crónica

La epidemiología de la pancreatitis crónica no está claramente definida y es difícil de caracterizar debido a la gran variabilidad de presentación de la enfermedad y a la localización retroperitoneal del páncreas, lo que hace que el diagnóstico de la enfermedad sea difícil.

La incidencia de la pancreatitis crónica ha ido incrementándose de manera significativa a lo largo de los años. Este incremento de la incidencia se ha intentado explicar por el aumento en el consumo de alcohol y por el uso de herramientas diagnósticas más sensibles. Aunque hay que tener en cuenta que las diferencias en los hábitos de alcoholismo y las diferencias genéticas en su metabolismo hacen difícil comparar la incidencia de la PC en países muy distintos, los estudios parecen indicar que es mayor en países industrializados. Por otra parte, también depende del sexo y de la etnia, siendo 2 veces superior en hombres que en mujeres y hasta 2-3 veces superior en población negra que en población blanca. En EEUU se ha encontrado una incidencia en población blanca de 41,7 por 100.000 habitantes (20), en Japón 36,9 por 100.000 habitantes(21) mientras que en otros países asiáticos existe una forma endémica de la PC que varía de 20-125 cada 100.000 habitantes. En España el último estudio epidemiológico realizado revela un aumento en el número de pacientes diagnosticados de PC con una incidencia de 50 casos cada 100.000 habitantes.

En muchas ocasiones, dependiendo de la etiología de la enfermedad, el diagnóstico de la pancreatitis crónica se realiza de forma tardía, ya que la aparición de las características clínicas aparecen después de un largo periodo en el que, a pesar de las lesiones del tejido, no aparece sintomatología.

La progresión de la enfermedad depende de los factores causales y eliminación o no de los mismos. La pancreatitis crónica tiene una alta mortalidad, cerca del 50% a los 20-25 años desde el inicio de la enfermedad, como resultado de las complicaciones (psuedoquistes, diabetes), por causa de otras enfermedades

asociadas (enfermedades cardiovasculares, infecciones o cáncer), o por el efecto del consumo continuado de alcohol o tabaco en el hígado pulmones o sistema digestivo(22). Concretamente, los pacientes con pancreatitis crónica tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de páncreas (23) que la población general, lo que representa un 3% de la muerte en pacientes con pancreatitis crónica.

### **3. Etiología y Factores de riesgo**

En los últimos años se ha incrementado el número de estudios que profundizan en el conocimiento de la naturaleza de la pancreatitis. Los avances en la genética y la aparición de nuevos modelos experimentales de estudio han contribuido a la identificación de nuevos factores implicados en el desarrollo de la pancreatitis crónica. Los principales factores de riesgo se recogen en el sistema de clasificación TIGAR-O (T: *Toxic-metabolic*; I: *Idiopathic*; G: *Genetic*; A: *Autoimmune*; R: *Recurrent and severe acute pancreatitis and O: Obstructive*) (11), desarrollado por *Midwest Multicenter Pancreatic Study Group* de EEUU con el fin de organizar, estudiar y determinar las posibles causas asociadas al desarrollo de PC. Este sistema de clasificación se basa en la prevalencia de cada etiología y cada clase está orientada hacia un potencial tratamiento:

#### **3.1. Tóxico-Metabólicos**

##### **3.1.1. Tóxicos**

La relación pancreatitis-consumo de alcohol se conoce desde 1878, cuando N. Freidreich utilizó el término de “páncreas alcohólico” para referirse a la asociación que observó entre consumo excesivo de alcohol y el daño pancreático(8). Actualmente el abuso del consumo de alcohol se considera la principal causa de pancreatitis crónica en países industrializados, siendo entre un 55-80% de los pacientes con pancreatitis crónica(11). En nuestra área sanitaria este porcentaje se sitúa alrededor de 60%. Un consumo prolongado de entre 10 a 20 años, de más de 5 bebidas alcohólicas por día (60g de alcohol/día) es suficiente para incrementar el riesgo de desarrollar pancreatitis crónica(24). Sin embargo, menos del 10% de las personas alcohólicas desarrollan pancreatitis crónica(25,26).

Por otro lado, en los últimos años numerosos estudios epidemiológicos han estudiado el papel del tabaco como factor riesgo independiente al alcohol en el desarrollo de la pancreatitis crónica(27), y se ha encontrado que esta asociación depende de la cantidad de tabaco consumido(28). Aunque no se ha encontrado una interacción entre alcohol y tabaco, sí existe una tendencia de sinergia entre ambos tóxicos en el desarrollo de la enfermedad (24). Otros estudios profundizaron en el papel de tabaco y encontraron una asociación con la progresión de la PC, de forma que el tabaco se asoció al desarrollo de complicaciones tales como calcificaciones o diabetes(29).

### 3.1.2. Metabólicos

Dos de los factores metabólicos que están más asociados con la pancreatitis crónica son la hipercalcemia y la hiperlipidemia. La hipercalcemia se ha asociado a pancreatitis aguda a través de mecanismos de activación de tripsinógeno y de sensibilización de tripsina(30), sin embargo, existen numerosos estudios que cuestionan la relación entre hipercalcemia y pancreatitis crónica(31). La hiperlipidemia se ha propuesto como un factor predisponente en un pequeño porcentaje de pacientes con pancreatitis crónica(32).

Otros factores de riesgo tóxico-metabólicos asociados a la pancreatitis crónica son el fallo renal crónico, fármacos (probablemente asociado a fallo renal) y toxinas como DBTC (dicloro dibutil-estaño)(11), aunque no se ha llegado a demostrar su papel como factor de riesgo.

### 3.2 Idiopáticos

Dentro de este grupo se sitúan pacientes que no tienen un claro factor de riesgo asociado a la enfermedad. Corresponde con un 10-30% de los pacientes de pancreatitis crónica. Aunque actualmente el porcentaje ha disminuido de manera significativa gracias a los avances en genética, estudios en inmunología y descubrimiento de factores ambientales asociados, sigue siendo el segundo grupo en importancia por el elevado número de pacientes que se incluyen en él.

La pancreatitis crónica idiopática se puede clasificar en inicio temprano o juvenil e inicio tardío o senil. La pancreatitis idiopática juvenil se presenta en la segunda

década de vida con dolor abdominal intenso; los cambios estructurales, la insuficiencia pancreática exocrina y el desarrollo de calcificaciones aparecen más tarde en el curso de la enfermedad. La forma senil de la enfermedad se inicia entre la quinta y sexta década de vida. Se caracteriza por ausencia de dolor en el 50% de los pacientes y en ocasiones presenta insuficiencia pancreática exocrina en el momento del diagnóstico.

Dentro de este grupo se sitúa también la pancreatitis crónica tropical, que aparece únicamente en regiones tropicales, fundamentalmente en zonas de Asia y África. Aparece predominantemente en niños y adultos jóvenes y se caracteriza por pérdida de función endocrina y exocrina. Actualmente se sugiere que existe una base genética en el desarrollo de este subgrupo de pancreatitis(33).

### 3.3 Genéticos

La pancreatitis crónica hereditaria tiene carácter autosómico dominante con una penetrancia de hasta el 80%. Está asociada a mutaciones en el gen que codifica para la enzima tripsinógeno catiónico o proteasa de serina 1 (PRSS1)(13). Mutaciones en este gen por un lado impiden que la tripsina activa se auto-degrade dentro de la célula acinar incrementando su función, y por otro estimulan la auto-activación(13). Otros genes asociados a la pancreatitis crónica son el SPINK 1 de su nombre en inglés *serine protease inhibitor Kazal-type 1* o el CFTR de *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. El SPINK 1 codifica para una proteína inhibidora de la tripsina, constituyendo la primera línea de defensa contra la tripsina activa en la célula acinar(34). En el caso del CFTR, este codifica para una proteína-canal transmembrana que está implicada en el transporte de bicarbonato y glutatión en células epiteliales. Mutaciones en este gen se ha asociado con el riesgo de desarrollar insuficiencia pancreática exocrina(35). SPINK1 y CFTR se consideran mutaciones predisponentes pero no causales de la PC.

Otros polimorfismos, como deficiencia en  $\alpha$ -1 antitripsina, se han asociado a PC, sin embargo no se ha llegado a confirmar su papel como factor de riesgo(36).

### 3.4 Autoinmunes

Corresponde con un 2-4 % de los casos de pancreatitis. Puede ser una enfermedad multisistémica (tipo I) o sólo afectar al páncreas (tipo II)(37). Se caracteriza por un aumento de  $\gamma$  globulinas o de IgG, presencia de anticuerpos, incremento de fibrosis pancreática e infiltración linfocitaria difusa, y ausencia de calcificaciones o pseudoquistes. Clínicamente, no suele presentar dolor o brotes de pancreatitis aguda, sin embargo aparece frecuentemente colestasis. Responde a tratamiento con esteroides(38).

### 3.5 Pancreatitis aguda recurrente y grave

Tras uno o más episodios de pancreatitis aguda (PA) o un daño grave del tejido, la recuperación puede no ser completa y como consecuencia se produciría una disfunción permanente del parénquima pancreático y fibrosis del mismo.

En este sentido, en el año 1999 aparece la hipótesis SAPE, *Sentinel Acute Pancreatitis Event*(39). Según este modelo hipotético, cuando un páncreas normal es sometido a un insulto, que puede ser de origen tóxico o puede tener una base genética, las células pancreáticas se estresan y comienzan a producir numerosas citoquinas y otras señales que dan lugar a una respuesta inflamatoria local; en este momento se inicia un episodio de pancreatitis aguda que se considera el “Evento Centinela”. Este episodio de PA tiene una fase temprana pro-inflamatoria y una fase tardía anti-inflamatoria. La fase tardía esta mediada por macrófagos y células estrelladas activadas y participan citoquinas anti-inflamatorias como IL-10. Bajo condiciones normales el episodio de PA se resuelve y el páncreas vuelve a su estado normal. Sin embargo, si el insulto continúa se suceden repetidos episodios de PA, que conlleva una respuesta anti- inflamatoria mantenida y en último término el desarrollo de fibrosis.

### 3.6 Obstructivos

La pancreatitis crónica de origen obstructivo está asociada a diferentes causas de obstrucción de los conductos pancreáticos, como consecuencia de pancreatitis aguda, páncreas divisum, tumores o traumatismos. Se produce una dilatación del

conducto, atrofia acinar y fibrosis difusa. En general, las alteraciones morfológicas pueden ser reversibles si la causa de la obstrucción es suprimida.

#### **4. Historia Natural de la Pancreatitis Crónica**

Independientemente de la etiología de la pancreatitis crónica, la destrucción progresiva del tejido, que evoluciona hacia fibrosis del parénquima pancreático en sustitución del parénquima funcional, y la atrofia glandular en estadios avanzados de la enfermedad son los responsables de la clínica de la PC.

El dolor es el síntoma principal, que aparece en un 85-90% de los casos de pancreatitis(1). Se localiza en el epigastrio, aunque se puede irradiar hacia los hipocondrios. Normalmente se presenta como dolor recurrente (tipo A) o continuo (Tipo B), sin embargo existe un subgrupo de pacientes que no presentan dolor. En estos casos, los pacientes tienen características de PC avanzada con síntomas de insuficiencia pancreática exocrina (IPE). El dolor se puede asociar con náuseas y vómitos que conlleva pérdida de apetito y por tanto, malnutrición y pérdida de peso. Habitualmente los episodios de dolor suelen remitir a lo largo del desarrollo de la PC, esta disminución coincide con la aparición de IPE. El origen del dolor es multifactorial y se atribuye a principalmente a alteraciones neurales y vasculares(40). Otros factores asociados son el consumo elevado de grasa (41), la obstrucción ductal, hipertensión intraductal y formación de pseudoquistes (42,40).

La PC avanzada se asocia con pérdida de función exocrina y endocrina. La esteatorrea y la pérdida de peso son síntomas que se asocian con una disminución de al menos un 90% de la capacidad normal de secreción del páncreas(43).La maldigestión de los lípidos ocurre antes que la de otros nutrientes (como proteínas o carbohidratos) ya que la secreción de lipasa disminuye más rápidamente que la de proteasa o amilasa. En cuanto a la diabetes se clasifica como tipo III (42)y se caracteriza por la destrucción de células beta (productoras de insulina) y células alfa (secretan glucagón). La evolución de la función exocrina o endocrina del páncreas también es dependiente de la etiología(44). De forma general, los pacientes con pancreatitis crónica alcohólica desarrollan insuficiencia pancreática exocrina tras unos 13 años desde el inicio de la enfermedad, mientras que en pancreatitis crónica idiopática aparece entre los 17-23 años de evolución.

La trombosis espleno-portal es una complicación de la PC infrecuente en la historia natural de la enfermedad, aparece aproximadamente en un 4% de los pacientes(45). Se produce como consecuencia de la compresión del eje espleno-portal por pseudoquistes pancreáticos, fibrosis o por agrandamiento de la glándula a consecuencia del proceso inflamatorio(46). La principal manifestación de la trombosis es la hemorragia digestiva secundaria a la rotura de varices gástricas o esofágicas(45). Otras complicaciones asociadas a las fases tardías de la enfermedad son la estenosis biliar y duodenal. La estenosis biliar tiene una prevalencia variable entre un 10-60% dependiendo del método de imagen utilizado y del estadio de la enfermedad(47). No siempre se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, por ejemplo en fases iniciales de la enfermedad se observa estenosis corta o de tipo I que se presenta en el 40% de los casos. En el caso de la estenosis duodenal es menos común que la obstrucción ductal y en ocasiones ambas complicaciones aparecen juntas(47).

## **5. Mecanismos Patogénicos**

Actualmente se acepta que los primeros eventos fisiopatogénicos de la pancreatitis crónica ocurren en la célula acinar, donde el evento principal es la activación temprana de las enzimas pancreáticas; pero además existen otros mecanismos patogénicos tales como la alteración de la homeostasis del calcio, la producción de estrés oxidativo, alteración en la secreción, procesos de muerte celular y sobreexpresión de factores inflamatorios.

De forma fisiológica la célula acinar sintetiza y secreta enzimas en su forma inactiva. Esta secreción está controlada por el nervio vagal cuyas neuronas postganglionares liberan acetilcolina o por estimulación hormonal, como la hormona colecistoquinina (CCK). La activación de esas proenzimas ocurre en el duodeno mediante una rotura hidrolítica llevada a cabo por proteasas. El tripsinógeno pancreático es la primera enzima en ser activada a tripsina mediante una enteroquinasa intestinal (enteropeptidasa), y posteriormente es la tripsina mediante procesos proteolíticos la que activa otras enzimas pancreáticas(48).

En una situación patológica, el tripsinógeno se puede activar de forma prematura dentro de la célula acinar. Las causas que producen esta activación son

desconocidas, sin embargo, se cree que podría estar implicada la enzima lisosomal catepsina B(49,50,51) o por auto-activación debido a pH ácidos dentro de las vacuolas. La tripsina, una vez activa puede activar otras proenzimas e iniciar la activación de la cascada enzimática dentro de la propia célula(52). Dentro de la célula acinar existen mecanismos de protección. En este sentido, la mayoría de las enzimas digestivas, y todas las proteasas son sintetizadas y almacenadas como pro-proteínas inactivas en forma de zimógenos, además, estos zimógenos se almacenan en gránulos lo que limita por un lado que proteasas activen las enzimas digestivas dentro de la propia célula acinar y que en el caso de que una pequeña parte se active está limitado el acceso a otros compartimentos de la célula acinar. Otro mecanismo sería la presencia del inhibidor de proteasas endógeno (SPINK 1). Finalmente, muchas proteasas, tales como tripsina aniónica o quimiotripsina C, dentro de la ruta de secreción, y algunas proteasas lisosomales son capaces de degradar la tripsina activa.

Por otra parte, el calcio se considera la principal molécula de señalización en la célula acinar implicada en la regulación de la secreción de enzimas(53). En situaciones patológicas existen cambios en la señalización del calcio citosólico como la pérdida de las oscilaciones de los niveles de calcio intracelulares lo que produce que los niveles de  $Ca^{+2}$  dentro de la célula acinar sean mantenidos(54). El incremento de  $Ca^{+2}$  conlleva la despolarización de la membrana mitocondrial por lo que se produce un fallo de la bomba de ATP sintasa lo que altera la producción de ATP mitocondrial(55). El resultado de esta depleción de ATP es la necrosis(56) o apoptosis(57) de la célula acinar. Por otra parte también se altera la secreción de enzimas pancreáticas asociada a modificaciones en las proteínas de membrana de los gránulos de zimógeno (58) o a la alteración de la reorganización de los filamentos de actina asociado a los procesos de exocitosis(59).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se generan tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y están implicados en numerosas funciones, incluido señales de transducción(60,61). De forma fisiológica son eliminados rápidamente mediante sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos(61). Si la producción de ROS excede la capacidad de los sistemas de protección se genera estrés oxidativo, que en la célula acinar tiene como consecuencia el bloqueo de la secreción enzimática (62) y además potencian la inflamación mediante activación de

cascadas que convierten a la célula acinar en un productor de citoquinas y quimioquinas (TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 o IL-1)(63,64). El estrés oxidativo fisiopatológico es resultado de alteraciones en los constituyentes celulares tales como, peroxidación lipídica, oxidación proteica, y modificaciones de los ácidos nucleicos, incremento de las concentraciones de calcio y alteraciones en las señales de traducción

Durante la pancreatitis, se han observado que existen dos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis. Muchos estudios experimentales han mostrado que la gravedad de la pancreatitis está íntimamente relacionado con la necrosis celular, de tal forma que a mayor cantidad de necrosis y menor de apoptosis, mayor es la gravedad de la enfermedad(65,66).

A nivel ductal se ha encontrado que, en fases tempranas de la enfermedad, la composición del fluido pancreático cambia, de forma que por razones desconocidas facilita la formación de depósitos de proteínas (precursores de calcificaciones).

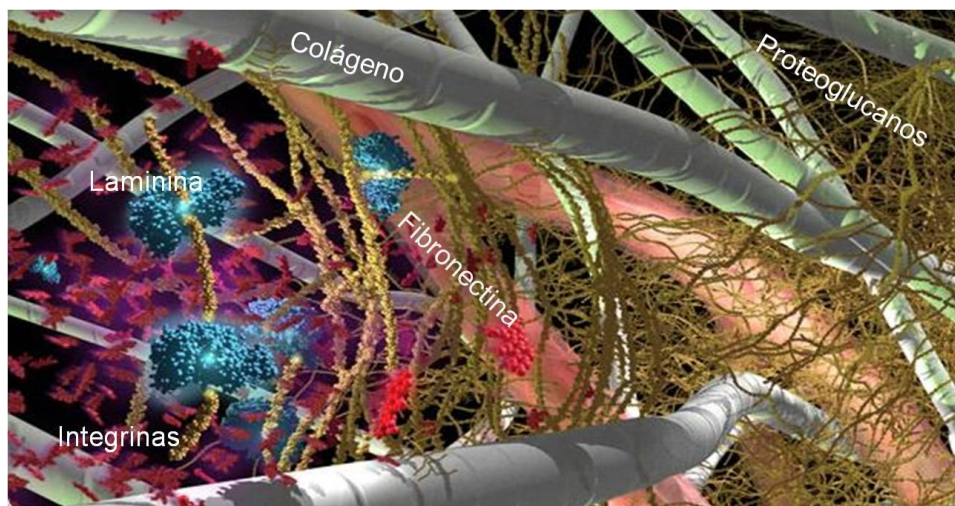
## **6. La fibrosis pancreática como característica de la Pancreatitis Crónica**

El proceso de fibrogénesis es una parte esencial de proceso de cicatrización del tejido que normalmente conlleva la restauración de la estructura y función del mismo(67). Sin embargo cuando este proceso fisiológico se descompensa, el resultado es una fibrosis patológica, que tiene como consecuencia una arquitectura y función anormal del tejido u órgano. La fibrosis pancreática es una característica histopatológica constante en la pancreatitis crónica y en el cáncer de páncreas. Se produce a consecuencia de procesos de necrosis/apoptosis, inflamación y obstrucción ductal. La fibrosis pancreática se puede definir como una acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular en los espacios intersticiales y en áreas dónde ha habido pérdida de células acinares o donde las células ductales están dañadas. Funcionalmente es la etapa final de los cambios en la patología pancreática y está asociada a la pérdida de función endocrina y exocrina. Se considera un proceso activo y dinámico, que en etapas tempranas puede ser reversible.

## 6.1. La matriz extracelular

En todos los tejidos, la matriz extracelular (MEC) actúa separando diferentes compartimentos tisulares y además proporciona señales específicas que controlan procesos como la proliferación, migración y supervivencia celular. Dentro de la MEC existe dos tipos de matriz, la membrana basal que actúa como barrera impidiendo el movimiento tanto de moléculas solubles como de células, y la matriz intersticial que confiere flexibilidad y elasticidad a los tejidos y está situada subyacente a la membrana basal(68). En un tejido sano, la arquitectura se mantiene por el mantenimiento del equilibrio entre la síntesis y degradación de MEC, sin embargo en estados patológicos, este equilibrio se rompe lo que produce que haya un depósito excesivo de las proteínas de MEC y el consecuente desarrollo de fibrosis(67).

La MEC está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglucanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina) (Figura 3)(69). Además son necesarios receptores integrina, que son responsables de la combinación de todas las señales de la matriz extracelular en las células.



**Figura 3. Esquema representativo de la matriz extracelular.** Modificada de (<http://biologiamedica.blogspot.com.es/2010/09/la-matriz-extracelular.html>)

En el caso del páncreas exocrino la matriz es diferente a la de otros órganos. Está compuesta por acinos y ductos que producen y transportan enzimas digestivas, además posee una densa capa de epitelio altamente compleja. En este caso, en lugar de la capa estromal que tienen otros tejidos, posee vasos sanguíneos a lo largo de los ductos y en los espacios entre los acinos dónde también existen células inflamatorias y mesenquimales, principalmente células estrelladas pancreáticas (PSC). Las PSC mantienen el tono vascular y contráctil de los vasos y de los ductos pancreáticos y la integridad del epitelio, conservando la membrana basal.

La membrana basal es una matriz extracelular especializada que se encuentra inmediatamente subyacente al tejido epitelial, cuya composición varía dependiendo del tejido y proporciona el soporte para la arquitectura epitelial. Los principales componentes de la membrana basal en el páncreas exocrino son la laminina y el colágeno tipo IV(68), sin embargo, durante la fibrogénesis del tejido se acumula colágeno de tipo fibrilar, predominantemente tipo I(70). Esta membrana basal se une al epitelio a través de los receptores integrina que mantienen la arquitectura del citoesqueleto y la cohesión tisular(71). Además existen una serie de proteasas denominadas metaloproteinasas de MEC (MMP), que tienen la capacidad de degradar la totalidad de los componentes de la MEC en su microambiente inmediato y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. La interacción de la MEC con la célula desencadena cascadas de señalización que promueven la diferenciación, migración y movilización celular, en relación con el mantenimiento de la homeostasis celular(72). Las MMP se sintetizan como zimógenos inactivos que son activados por proteólisis en el espacio extracelular y además existen inhibidores específicos de su actividad, inhibidores tisulares endógenos (TIMPs) que reducen la degradación proteolítica excesiva de la MEC(73).

#### 6.1.1. Proteínas estructurales: El colágeno

El colágeno es la familia de proteínas más abundantes en el organismo (constituye el 25% del total de las proteínas). Es el componente principal de la matriz extracelular y los tejidos conectivos. Son proteínas largas, rígidas, con estructura helicoidal en la que se unen tres cadenas (cadenas  $\alpha$ ) formando una superhélice.

Son ricos en prolina y glicina, que ayudan al ensamblaje de las tres cadenas  $\alpha$ . Aunque existen 25 tipos de cadenas  $\alpha$  distintas, cada uno codificado por un gen diferente, sólo se han encontrado 20 tipos de moléculas de colágeno.

Los principales tipos de colágeno que se encuentran en el tejido conectivo son los tipos I,II,III, V y XI, éstos tienen estructuras fibrilares, y una vez son secretados al espacio extracelular se ensamblan para formas polímeros denominados fibrillas de colágeno. Los de tipo IX y XII son colágenos que aparecen asociados a la superficie de las fibrillas de colágeno uniéndolos entre sí y con otros componentes de la matriz. Los colágenos de tipo IV son el principal componente de la membrana basal madura y aparecen formando una red(69).

#### 6.1.2. Proteínas de adhesión: La fibronectina

La fibronectina es una proteína presente en la matriz extracelular que está implicada en la adhesión de las células a la matriz y en la orientación de las células que migran durante la embriogénesis. Estructuralmente es una proteína dimérica compuesta por dos grandes subunidades unidas por puentes disulfuro en uno de los extremos(69); posee diferentes dominios de unión, entre ellos un sitio de unión para el colágeno y otro para sus receptores de superficie, que son las integrinas. Existen numerosas isoformas de fibronectina, la fibronectina plasmática es soluble y circula en sangre y otros fluidos, donde cumple funciones relacionadas con la coagulación, cicatrización de heridas y fagocitosis. Las otras formas están situadas en la superficie celular y se depositan en la matriz extracelular, siendo estas formas altamente insolubles. Todos los tipos de fibronectina están codificados por un único gen que mediante *splicing* alternativo producen las distintas isoformas de la proteína. Concretamente, la forma celular de la fibronectina puede contener dos lugares de *splicing* alternativo, que son repeticiones de tipo III, que se denominan dominio extra A (EDA) y dominio extra B (EDB) en humanos, mientras que en roedores serían EIIIA y EIIB(74,75,76).

## 6.2. Mecanismos moleculares

Los mecanismos moleculares de inicio y mantenimiento de la fibrosis del páncreas han sido poco estudiados, sin embargo muchos de los pasos de este proceso son similares a los observados en la fibrosis hepática. El evento principal de la fibrogenesis pancreática es la activación de células estrelladas pancreáticas (PSC) y la consiguiente producción y deposición de proteínas de MEC que consiste principalmente en colágeno tipo I y III y fibronectina.

De forma general durante la primera etapa de la fibrogenesis se produce daño de las células mesenquimales del intersticio, de las células ductales y/o a las células acinares dependiendo del factor etiológico (Tabla 1). Este daño celular conlleva la necrosis y/o apoptosis celular que tiene como consecuencia la liberación de citoquinas y factores de crecimiento, entre ellos factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o C-C o C-X-C quimiquinas. También induce la migración de células inflamatorias, especialmente macrófagos y células epiteliales o mesenquimales preexistentes(77,78).

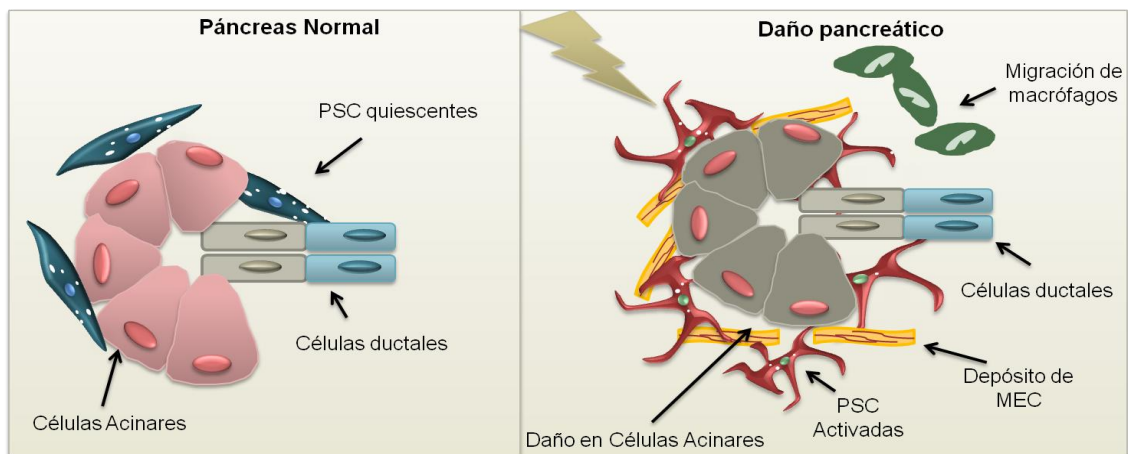
<b>Etiología</b>	<b>Distribución</b>
PC Alcohólica	Fibrosis Inter-Lobular
PC Hereditaria	Fibrosis Peri-Ductal
PC Autoinmune	Fibrosis Inter-lobular o Peri-Ductal
PC Obstructiva	Fibrosis Intra-Lobular

**Tabla 1. Patrón de distribución de la fibrosis pancreática en función de la etiología de la pancreatitis crónica(79).**

En un segundo estadio, las células dañadas son fagocitadas por macrófagos y la liberación de citoquinas estimula la activación y proliferación de las células estrelladas pancreáticas en el sitio donde se está produciendo el daño(80,81). Sin embargo, puede ocurrir que el paso uno y el dos ocurran simultáneamente. En el caso de la PC de origen tóxico, el alcohol activaría directamente las PSC y por lo tanto la necrosis o apoptosis de los otros tipos celulares pancreáticos y la activación y proliferación de las células estrelladas ocurriría al mismo tiempo(82,83).

En la última fase, las PSC producen el depósito de la MEC, que reemplaza el infiltrado inflamatorio y que afecta a la arquitectura y función del tejido sano (Figura 4). Para que se produzca el depósito de MEC, las PSC son capaces de producir metaloproteinasas entre ellas MMP-2 y MMP-9, que tienen la habilidad de destruir la MEC normal, colágeno IV y V, así como la gelatina y la elastina(73), localizada en zonas pericelulares y favorece la deposición de colágeno I y III y de fibronectina(84).

De forma general, si el factor causal desaparece, el depósito de MEC no se mantiene y las PSC entran en apoptosis o vuelven a su estado quiescente.



**Figura 4. Esquema representativo de los eventos durante el daño pancreático.** Los cambios en respuesta a daño pancreático en el espacio intercelular incluyen alteraciones en las células pancreáticas y cambios en la composición de la MEC. La activación de las células estrelladas conlleva la acumulación excesiva de la MEC, como resultado hay una pérdida de la arquitectura y la función del páncreas. Modificado de Friedman 2008 (14).

### 6.3. Distribución de la fibrosis dependiendo de la etiología

#### 6.3.1. Pancreatitis crónica alcohólica

La principal característica histopatológica en la pancreatitis crónica de origen alcohólico es la autodigestión del tejido que conlleva la necrosis del mismo(85). Como consecuencia de la necrosis, se produce una respuesta inflamatoria y hemorragia de la glándula con lo que se inicia la fibrosis en el lugar donde sucedela

necrosis inicial(86). Los macrófagos y las plaquetas de las áreas con necrosis hemorrágica van a liberar factores de crecimiento y citoquinas, como el TGF $\beta$  y PDGF, que van a tener efectos paracrinos, sobre células acinares, ductales y sobre PSC/fibroblastos existentes, y autocrinos, sobre las propias células estrelladas(87,83). Debido a que el foco de autodigestión se sitúa en los espacios intersticiales alrededor de los lóbulos acinares y entre los lóbulos ductales, la fibrosis se extiende con un patrón interlobular o perilobular(88). Debido a esto, el flujo de las secreciones pancreáticas se encuentra alterado. El elevado contenido en electrolitos y proteínas promueve la precipitación de las proteínas formando calcificaciones intraductales, con lo que se produce obstrucción que conlleva atrofia acinar y la fibrosis intralobular. Cuando la fibrosis se expande al área lobular, la fibrosis confiere una distribución difusa(88).

#### 6.3.2. Pancreatitis hereditaria

Mutaciones en el gen del PRSS1 o en su inhibidor, SPINK 1, están asociadas a la activación de la tripsina dentro de la propia célula acinar, que conlleva la autodigestión del tejido y la consecuente necrosis y el inicio de la respuesta inflamatoria(13,34). Esta activación intracelular también va a afectar a las células ductales. En estos casos, se ha encontrado que la fibrosis del tejido tiene una distribución periductal, donde los ductos aparecen dilatados y con numerosas calcificaciones intraductales(89).

#### 6.3.3. Pancreatitis autoinmune

Histológicamente se caracteriza por infiltrado linfoplasmático y fibrosis que se localiza en los ductos, produciendo el estrechamiento de los mismos y ocasionalmente su destrucción. La inflamación afecta al tejido acinar e incluso la destrucción del mismo. Durante el curso de la inflamación se desarrolla la fibrosis del tejido que se encuentra en áreas periductales y posteriormente interlobulares. Finalmente, la fibrosis tiene una distribución difusa a lo largo de toda la glándula(38). En el caso que la lesión fibrótica tenga una distribución alargada adquiere una apariencia como de tumor y se presenta como un pseudotumor inflamatorio.

#### 6.3.4. Pancreatitis obstructiva

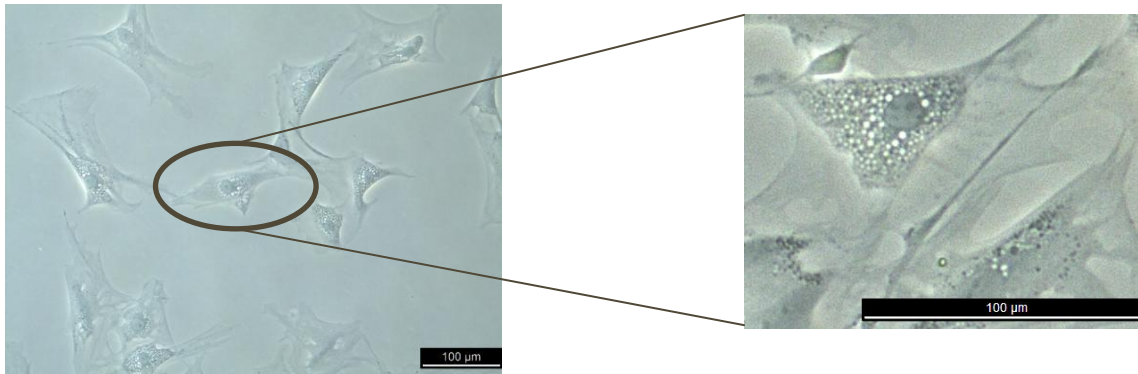
La obstrucción del conducto principal o de algún ducto secundario del espacio interlobular produce estenosis del ducto y atrofia acinar que es remplazando por tejido fibrótico(88). El área que se ve afectada en el proceso fibrogénico en este tipo de pancreatitis se sitúa en el cuerpo y cola de la glándula por lo tanto en áreas interlobulares combinada con áreas intralobulares con igual distribución en ambas regiones(90).

### **7. Las Células Estrelladas Pancreáticas**

#### 7.1. Biología de las células estrelladas pancreáticas

En el cuerpo humano, las células estrelladas se encuentran en numerosos órganos tales como, hígado, pulmones, páncreas, riñón, intestino, bazo, glándula adrenal, conducto deferente y cuerdas vocales, donde muestran una localización perivascular. Concretamente, las células estrelladas pancreáticas (PSC) han cobrado gran importancia en los últimos años, ya que no ha sido hasta el año 1982, cuando fueron observadas por primera vez (15), y hasta el 1998 cuando se aislaron y caracterizaron (17,18) en animales de experimentación y en humanos. Los métodos de aislamiento utilizados se basan en que las PSC poseen numerosos gránulos lipídicos en su citoplasma, con lo que tienen una densidad menor a otros tipos celulares, por ello se pueden separar creando un gradiente de densidad en una suspensión de células pancreáticas(17). En el páncreas sano, las PSC se localizan en áreas basolaterales de las células acinares pero también en áreas periductales y perivasculares dentro del parénquima pancreático donde actúan captando posibles cambios en la homeostasis de la glándula. En este estado (inactivo o quiescente) requiere de tinciones especiales para ser detectadas ya que son escasas, entre un 4-7% de todos los tipos celulares pancreáticos, y sus cuerpos celulares son planos con proyecciones citoplasmáticas que se extienden a lo largo de las células adyacentes. A microscopio electrónico se distingue un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado, fibras de colágeno y vacuolas

(gránulos lipídicos) alrededor de un núcleo central. Los gránulos lipídicos almacenan vitamina A, que se pueden ver en cultivo por autofluorescencia de la propia vitamina A al exponerlo a luz UV (328nm)(15) y expresan marcadores específicos como la desmina o la proteína fibrilar glial ácida (GFAP). Por otra parte, las PSC tienen una baja capacidad mitótica y de síntesis de proteínas de matriz extracelular (Figura 5).



**Figura 5. Fotografía de células estrelladas pancreáticas de rata en cultivo primario.** Zoom de los gránulos de vitamina A intracitoplasmáticos.

Durante los últimos años se ha constatado el papel fundamental de las PSC en el desarrollo de la fibrosis pancreática en la pancreatitis crónica y el cáncer de páncreas(17,87). En respuesta a daño pancreático, las PSC existentes en el páncreas se transforman a su fenotipo activado que se considera el evento central en la fibrogénesis pancreática, conlleva un incremento de la síntesis y deposición de proteínas de matriz (MEC) que conduce a la fibrosis del tejido.

## 7.2. El origen de las células estrelladas pancreáticas

Existe controversia en cuanto al origen de las PSC. Se cree que podrían tener tanto origen mesodérmico(91), endodérmico(92) o neuroectodérmico(93), sin embargo ningún estudio ha abordado esta cuestión hasta la fecha. Tanto el origen neuroectodérmico como el mesodérmico han sido considerados como posibles orígenes de las células estrelladas hepáticas (HSC)(91,93). Las células hepáticas comparten un gran número de características con las PSC, de hecho en un estudio comparativo entre fibroblastos y células estrelladas hepáticas y pancreáticas demostraron que HSC y PSC son diferentes a los fibroblastos y que comparten

muchas homologías incluyendo expresión de genes relacionados con la expresión de proteínas de MEC, contractibilidad, metabolismo de los retinoides y factores de crecimiento(94). Además HSC y PSC sólo se diferencian en la expresión de 29 genes(19). Por todo ello, se cree que PSC y HSC tengan un origen común.

Teniendo en cuenta que durante el daño pancreático se incrementa el número de PSC, el debate del origen de las PSC está todavía abierto. Aunque hay estudios que sugieren que las PSC se originan en la médula ósea que contribuyen tanto a la población quiescente como activada(95), sin embargo, su capacidad tanto proliferativa como de migración y la capacidad de transición epitelio o endotelio-mesénquima también debe de contribuir a la población de PSC activadas durante el daño pancreático.

### 7.3. Papel de las células estrelladas como inductoras de fibrosis

Hasta la caracterización de las células estrelladas pancreáticas, la fibrosis pancreática se consideraba un epifenómeno del daño crónico del tejido, a partir de entonces, son numerosos los estudios que se han centrado en el papel de las PSC como inductoras de fibrosis. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos en páncreas de pacientes con pancreatitis crónica y en modelos de animales de experimentación de fibrosis pancreática han establecido que el colágeno I es la proteína de matriz extracelular mayoritaria en áreas fibróticas, y además estas áreas son positivas para  $\alpha$ -SMA lo que sugiere que hay PSC activadas en esa zona(80). Por otra parte, mediante una hibridación in situ, se ha comprobado que las PSC expresan ARNm de colágeno I lo que sugiere que las células estrelladas activadas son la principal fuente del mismo en las áreas fibróticas. También se ha observado que las células acinares adyacentes a las áreas fibróticas son positivas para TGF $\beta$ , sin embargo los acinos alejados de dichas áreas no lo son; este hecho se relaciona con el efecto paracrino del factor de crecimiento sobre las PSC(80). Existen también productos de peroxidación lipídica (4-hidroxi-2,3-noneal) lo que indica que hay un incremento de estrés oxidativo(96), y además in vitro se conoce que las PSC responden al estrés(82). Finalmente, el incremento de la expresión de PDGF podría ser el responsable del incremento del número de PSC en áreas fibróticas, debido por un lado al efecto mitogénico (proliferación local de las PSC) y

al efecto quimiotáctico (reclutamiento de las mismas hacia áreas afectadas por el daño)(87,97).

Para poder caracterizar a lo largo de un periodo de tiempo la fibrogénesis y el papel de las PSC en las etapas tempranas de dicho proceso, se han utilizado numerosos modelos animales. Entre los modelos más utilizados están la inyección de tóxicos como el 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS)(98), inyecciones repetidas del secretagogo caeruleína (análogo del secretagogo CCK)(99,100), cirugía obstructiva del conducto pancreático (101) o el uso de animales modificados genéticamente que dan lugar a una sobreexpresión del TGF $\beta$ (102). Otros modelos han utilizado el alcohol en la dieta junto con otro factor desencadenante(103,104). Estos últimos se basan en la premisa que el alcohol sólo no es suficiente para causar daño pancreático evidente y que por lo tanto otro factor es necesario para iniciar el daño pancreático(104). En general se observó que las PSC se activaban en etapas tempranas en el curso del daño pancreático, y que eran la principal fuente de colágeno en áreas fibróticas. También se encontró un incremento en el número de células estrelladas(80).

El siguiente paso en el estudio del proceso de la fibrogénesis fue el de identificar los factores específicos responsables de la activación de las PSC durante el daño pancreático; para ello se basaron en el conocimiento previo de los estudios *in vivo*. Estos estudios se centraron en los procesos de proliferación, expresión de  $\alpha$ -SMA, síntesis de proteínas de MEC, producción de MMPs, migración, pérdida de gránulos de vitamina A, liberación de citoquinas y contractibilidad(87,80,105,106,107). En estos estudios se comprobó que las PSC migran hacia la zona donde se está produciendo el daño y proliferan localmente en respuesta al factor de crecimiento PDGF(106). Además la activación previa de las PSC es necesaria para que adquieran la capacidad de migrar(106). Por otra parte, existe una expresión significativa del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) en páncreas fibróticos humanos, confirmándose su papel como citoquina profibrogénica(80). Además el TGF $\beta$  estimula la síntesis y secreción de colágeno, fibronectina y laminina e incrementa la producción de MMP2(108,87). Esta metaloproteinasa promueve la fibrosis ya que facilita la deposición de colágeno fibrilar (anormal) degradando la matriz normal de colágeno.

#### 7.4. Activación de las células estrelladas pancreáticas

La activación de las PSC es considerada la respuesta de cicatrización después del daño pancreático; un proceso que no es patológico en sí mismo. De hecho recientemente se ha sugerido que las PSC contribuyen a la regeneración después de una pancreatitis aguda necrotizante en humanos(109). Sin embargo, repetidos episodios de daño tisular y la estimulación persistente de las células estrelladas conllevan la fibrosis del tejido seguida de la pérdida de función del tejido y la progresión a cáncer de páncreas.

En respuesta a diferentes estímulos las PSC pasan a un estado “activado”. En este estado ocurren cambios morfológicos y metabólicos en las células: cambia de morfología a una fenotipo demiofibroblasto, pierden los gránulos de vitamina A, expresan actina alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), se incrementa su proliferación, son capaces de migrar, producen grandes cantidades de componentes de matriz extracelular (colágeno de tipo fibrilar y fibronectina), degradan la matriz por la producción de metaloproteinasas y liberan citoquinas(17,18,80) (Figura 6).

- Cambio de fenotipo

Dentro de los posibles marcadores del fenotipo activado de las PSC, el más utilizado para estudiar el cambio de fenotipo es el  $\alpha$ -SMA. Es una proteína del citoesqueleto cuyo incremento proporciona un aumento del potencial contráctil. Más que un marcador de activación de las células per se, se considera un marcador de transdiferenciación que indica el fenotipo de miofibroblasto que adquieren las PSC activadas. En concreto se sabe que tras 48 horas en cultivo el 90% de las PSC muestran marcaje positivo para esta proteína(17), siendo además más específica que otros marcadores musculares, como la desmina(110).

Otros marcadores en PSC serían los siguientes: la desmina, aunque es altamente variable entre diferentes especies; la nestina que todavía no presenta evidencias

suficientes como para monitorizar la activación de las PSC en humano y roedores; y finalmente la proteína fibrilar glial ácida (GFAP), que no se expresa en fibroblastos y además es selectiva en ratas y humanos y es otro de los marcadores más utilizados. Por otra parte, durante la activación de las células estrelladas existen cambios en la expresión génica que se podrían utilizar como marcadores del fenotipo activado. Genes como Notch3, proteína secretada relacionada con frizzled 5 (SFRP5), Wnt4 y Wnt5a, se expresan tras la activación de las PSC, sin embargo se necesitan estudios para validar la expresión de estos genes como marcadores en la activación de las PSC.

- Gránulos de Vitamina A

Los mecanismos por los cuales las PSC acumulan o pierden los gránulos de vitamina A están todavía en estudio. Recientemente se ha postulado que la albumina, proteína endógena en PSC y que se co-localiza con la vitamina A en los gránulos lipídicos, está implicada en la formación de los gránulos, ya que hace a las células más resistentes a la capacidad activante del TGF $\beta$ , y en células activadas estimula la reaparición de los mismos(111).

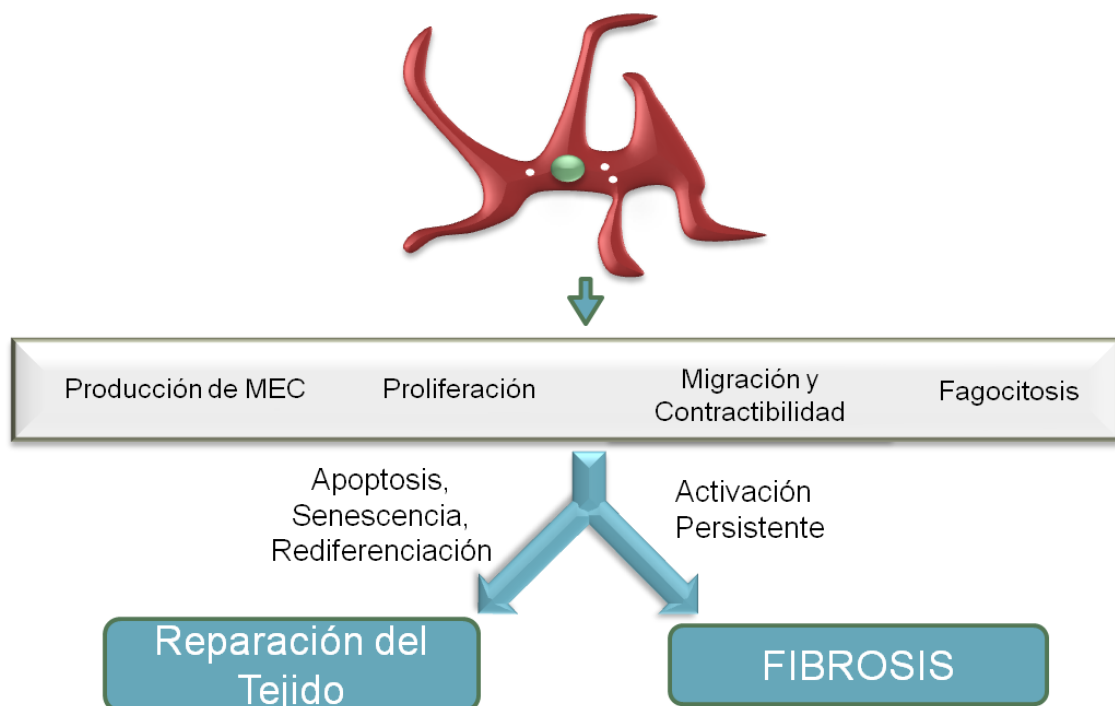
- Proliferación

La proliferación es una característica fundamental en la fibrosis pancreática. La proliferación de las PSC se incrementa en respuesta a citoquinas, estrés oxidativo y factores de crecimiento(18,87). Se ha demostrado que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es el principal mitógeno de las PSC e incrementa la proliferación tanto in vivo como in vitro(108).

- Migración

La migración es un proceso complejo donde están implicados cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina y miosina de la célula. Es esencial en gran número de procesos como cicatrización, colonización (metástasis) o ingeniería tisular(112). Las PSC tienen la capacidad de migrar hacia áreas donde se está produciendo el daño pancreático y es necesario un cambio de fenotipo (a fenotipo activado) para que exista migración(106).

Tras la activación de las PSC pueden ocurrir dos fenómenos, por un lado que la inflamación y el daño se mantenga; repetidos episodios de daño tisular y la continua estimulación de las PSC con los estímulos profibróticos, conlleva una activación de PSC persistente y el desarrollo de fibrosis patológica lo que llevaría a la pérdida de función de la glándula y a la progresión de la PC. Por otro lado, si la inflamación y el daño se controlan y no se repiten, las PSC pueden entrar en apoptosis o desdiferenciarse a su estado quiescente. En este caso no se desarrolla fibrosis sino que conlleva la cicatrización del tejido. La desdiferenciación se ha observado *in vitro*, y más recientemente *in vivo* en respuesta a vitamina A, que induce la quiescencia de las PSC por disminución de la activación de la ruta de las MAP kinasas(113). La apoptosis se ha observado en varios estudios(114), concretamente, los tocotrienoles de la vitamina E inducen apoptosis y autofagia en PSC activadas de rata y este tratamiento no afecta a las PSC en estado quiescente o a otras células pancreáticas(115). Una tercera vía que puede estar implicada es la senescencia celular, de hecho en un estudio en ratas se ha observado que limita la respuesta fibrogénica al daño tisular agudo a través de la activación del inhibidor del ciclo celular Cdkn1a(116). Además los linfocitos tendrían un papel dual, ya que por un lado desencadenan la activación de las PSC y por otro, participan en la eliminación de las PSC senescentes mediada por *natural killers* (NK)(117).



**Figura 6. Esquema representativo de los procesos asociados a la activación de las células estrelladas pancreáticas.** Modificado de Omary MB y col 2007 (4).

### 7.5. Factores de activación en las células estrelladas pancreáticas

Numerosos estudios se han centrado en el estudio de posibles factores de activación de las PSC en cultivo (Figura 7).

El alcohol y sus metabolitos: Entre los factores encontrados hasta ahora, el alcohol y sus metabolitos (acetaldehído y etil-esteres de ácidos grasos) han cobrado gran importancia por ser un factor conocido de la pancreatitis crónica (ver el papel de los tóxicos en el páncreas). Este factor activa directamente las PSC a través del metabolismo del alcohol a acetaldehído por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) generando así estrés oxidativo dentro de la propia célula y manteniendo además el fenotipo activado de las PSC.

Endotoxina bacteriana: Se ha estudiado el papel de los lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS) como posible desencadenante de la fibrosis pancreática(104). Se ha observado que la presencia de LPS inhibe la apoptosis de las PSC y al mismo tiempo estimula la proliferación de las mismas. Además se sugiere que el alcohol y las endotoxinas podrían tener un efecto sinérgico en la activación y la supervivencia de las PSC(104).

Citoquinas y factores de crecimiento: Hoy en día se conocen numerosas citoquinas y factores de crecimiento capaces de activar las PSC de una manera paracrina y autocrina durante el daño pancreático(17,18,87,4). Estas citoquinas pueden ser secretadas por células acinares, ductales, epiteliales, células inflamatorias, plaquetas y células cancerígenas además de por las propias PSC. El PDGF es secretado por varios tipos celulares incluidos plaquetas, células mononucleares y macrófagos activados durante la inflamación(77); tiene un potente efecto quimiotáctico sobre las PSC y además estimula su proliferación(118) a través del aumento de receptores para PDGF en la superficie de PSC(87,108). El TGF $\beta$  y su efector en la ruta de señalización, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), se han identificado como mediadores de la estimulación de la síntesis de matriz por parte de las PSC. El TGF $\beta$  estimula la activación de las PSC, esto

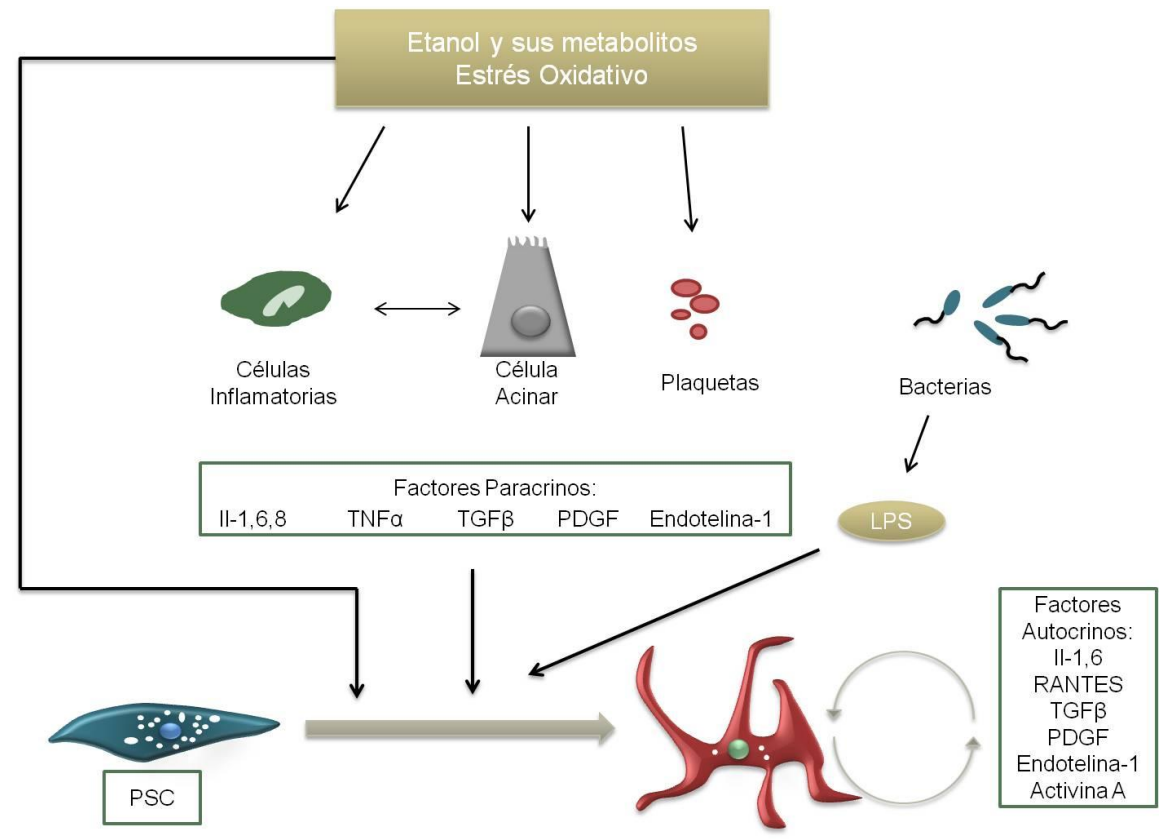
conlleva la síntesis y secreción de proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina y laminina) por parte de estas células(87,108). Además, el TGFβ estimula la síntesis de MMP-2 por parte de las PSCs favoreciendo el depósito de colágeno fibrilar. Por otra parte, incrementa la síntesis de receptores para PDGF en las PSCs perpetuando de la fibrogénesis(87). Las citoquinas proinflamatorias producidas en etapas tempranas durante la pancreatitis aguda, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y algunas interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-13) estimulan la activación (expresión de  $\alpha$ -SMA) de PSC(105,119). Concretamente el TNF $\alpha$  estimula además la proliferación y la síntesis de colágeno tipo I que está regulado a nivel post-transcripcional en PSC(105), Por otro lado, la IL-13 promueve la proliferación de las PSC por la disminución del efecto autocrino del TGFβ a través de una reducción de la actividad del NFκB; sin embargo, este sistema receptor de IL-13 no se ha observado en humanos, sólo en ratas(119).

Además las propias PSC tienen la capacidad de producir mediadores inflamatorios, entre ellos TGFβ, CTGF, TNF $\alpha$ , IL-1β, IL-6, PDGF que contribuyen a perpetuar su fenotipo activado incluso en ausencia del factor inicial de respuesta de la activación de las PSC. Entre ellos, la activina A que pertenece a la familia del TGFβ y tiene funciones en la activación de las PSC por vía autocrina incrementando la expresión de colágeno y la expresión y secreción de TGFβ1(120). La producción de estas moléculas puede ser producida por estímulos endógenos (como por ejemplo el alcohol) o por las propias citoquinas producidas por las PSC(105). Un ejemplo sería la IL-6 producida por el estímulo de TGFβ y viceversa (121).

El estrés oxidativo: Está demostrado que el estrés celular también activa las PSC y además está implicado en otras funciones celulares como la síntesis de colágeno fibrilar(122). Existen además algunos estímulos como el alcohol que ejerce su efecto en las células estrelladas a través de la peroxidación lipídica dentro de la propia célula (82). Por otra parte las PSC expresan NADPH oxidasa que genera intracelularmente especies reactivas del oxígeno y que por tanto median la activación de las propias PSC(123,124).

El incremento de presión: Otro de los factores implicados en la activación de las PSC es el incremento de la presión debido al “síndrome compartimental” de las

pancreatitis crónica, que conlleva una perfusión disminuida en el sistema gastrointestinal, e isquemia intestinal que incrementaría la permeabilidad del intestino y con ello la translocación bacteriana a través de la barrera epitelial. Además induce la síntesis de proteínas de MEC y de citoquinas por parte de las PSC, mediado por el estrés oxidativo producido por las consecuencias del aumento de presión(125).



**Figura 7. Mecanismos de activación de las PSC.** La exposición a tóxicos y sus metabolitos generan ROS que produce la activación de las PSC y la producción de factores que de forma autocrina estimulan la activación de las mismas. Los factores paracrinos son derivados de otros tipos celulares. Modificado de Omary MB y col. 2007 (4).

Otros factores: Existen otros factores que están asociados a la activación de las PSC y que se encuentran sobreexpresados en PC. Entre ellos destaca la endotelina-1, que tiene efectos profibrogénicos y proinflamatorios en el páncreas; concretamente se expresa en PSC y estimula su migración y contracción(126)(127).

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) que es una molécula proinflamatoria que podría estar implicada en la perpetuación del fenotipo activado(128). La galectina-1 que induce la activación de las PSC, estimula la proliferación y la producción de citoquinas, entre ellas MCP-1(129). El fibrinógeno que induce la producción de citoquinas y la síntesis de colágeno en PSC (107). Finalmente la hiperglucemia, que se ha observado en animales de experimentación que incrementa la activación, proliferación y estimula la síntesis de colágeno tipo I(130).

#### 7.6. Funciones de las células estrelladas pancreáticas.

Las células estrelladas, además de su papel como efectoras en la fibrosis pancreática, cumplen otras funciones celulares implicadas en la homeostasis del tejido, aunque su papel en el páncreas sano ha sido poco estudiado.

Regulación del balance de la matriz extracelular: como ya se ha indicado las PSC además de producir proteínas de matriz extracelular, sintetizan enzimas de la familia de las metaloproteinasas (MMPs) que degradan la matriz, y sus inhibidores, los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPS). Por lo tanto, las PSC tienen la habilidad de producir y degradar la matriz jugando un papel fundamental en el mantenimiento del tejido normal(84). Por otra parte regulan la integridad epitelial a través del mantenimiento de la membrana basal. Los receptores integrinajuegan un papel fundamental en la unión célula-célula y célula-MEC en diferentes tejidos. Concretamente el receptor integrina  $\beta 1$  presente en la superficie de las células del páncreas, es el responsable de la unión a la matriz extracelular con el citoesqueleto intracelularmediando la movilidad celular, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular(131,71). La deficiencia de la integrina  $\beta 1$  en las PSC tiene un efecto directo sobre la expresión de proteínas de MEC que a su vez afecta a las receptores integrina de las células acinares de tal forma que se reduce la producción de zimógenos (pérdida de función exocrina) y disminuye la supervivencia celular (71). Por lo tanto las PSC mantienen la homeostasis del parénquima pancreático.

Como células progenitoras: Recientemente se ha barajado la hipótesis de la capacidad de las PSC como células progenitoras. Se ha comprobado que las PSC que son resistentes al mitoxantrona (fármaco que impide la proliferación de células

tumorales), expresan un marcador de células madre, el transportador ABCG2 (donde ABC es uno de los dominios de unión a ATP) y son capaces de secretar insulina después de la diferenciación celular(132). Sin embargo, es necesario corroborar este papel como células progenitoras analizando otros tipos de marcadores de células madre y comprobar que son capaces de transformarse en otros tipos celulares.

Regulación del tono vascular y ductal del páncreas: La expresión de  $\alpha$ -SMA incrementa del potencial contráctil que además también está regulado por la endotelina-1(127). Debido a su localización en áreas peri-ductales y perivasculares, el potencial contráctil de las células está implicado en la regulación de tono vascular y ductal del páncreas.

Inmunidad local en el páncreas: Las PSC tienen capacidad de endocitar y fagocitar cuerpos extraños, debris de procesos necróticos y células polimorfonucleares viejas(133); esta función está asociada con la muerte celular por necrosis de la propia célula estrellada. Por otra parte, se ha especulado que pueden tener función inmunológica innata ya que expresan receptores *Toll-like* (TLRs), que son proteínas implicadas en la activación de este tipo de inmunidad(104,133). Concretamente expresan, TLR2 que reconoce patrones moleculares de bacterias Gram +, TLR3 que reconoce doble cadena de ARN durante la replicación viral, TLR4 que reconoce lipopolisacáridos de pared de bacterias Gram - y TLR5 que reconoce flagelina (componente de flagelos bacterianos). Más recientemente se ha investigado la posible capacidad de las PSC de actuar como célula presentadora de antígeno (función inmunidad adquirida). Sin embargo, en células de rata se ha visto que las PSC, al contrario de las HSC, no expresan marcadores de células presentadoras de antígeno como las moléculas MHC de clase II(134).

Regulación de secreción de enzimas: Las PSC actúan como intermediarias en la regulación de la secreción de enzimas pancreáticas inducidas por colecistoquinina (CCK). Recientemente se ha demostrado que las PSC expresan receptores 1 y 2 para la hormona gastrointestinal CCK en humanos y en rata(135). Estos receptores de CCK están implicados en la regulación de importantes funciones de las PSC como es la activación, la proliferación y la síntesis de colágeno I(135).

Concretamente se ha visto que las PSC responden a la CCK(135)produciendo acetilcolina (Ach) que actúa sobre los receptores muscarínicos de las células acinares(136).Además en co-cultivo se ha comprobado que hay un incremento de amilasa que se inhibe al bloquear los receptores muscarínicos(136).

Producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias: Entre las citoquinas producidas por las PSC activadas se ha identificado la IL-10(137). La IL-10 es una potente citoquina antiinflamatoria que limita la gravedad de la pancreatitis aguda, y además reduce la expresión de TGF $\beta$  liberado por células inflamatorias(138).

Angiogénesis: Las PSC producen factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) de forma constitutiva y su producción se incrementa en hipoxia(139). También produce otras moléculas relacionadas con la angiogénesis como son los receptores para VEGF (Flt-1 y Flk-1), angiopoietina-1 y su receptor Tie-2, y vasohibina-1.

Metabolismo de la glucosa: Se ha encontrado que las PSC expresan transportadores de glucosa, concretamente Glut 1 y Glut 3(137), que tienen gran afinidad por la glucosa, y también son capaces de transportar galactosa.

### 7.7. El proceso inflamatorio: La fractalquina (CX3CL1)

Como ya se ha descrito, la activación de las PSC está asociada al reclutamiento de monocitos y macrófagos y la liberación de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Las quimioquinas están implicadas en la migración y activación por unión a receptores de la superficie celular específicos en sus células diana. Algunas de estas citoquinas, como IL-8, IL-15, MCP-1 o la CX3CL1 (fractalquina) y RANTES (Regulador de la Activación de las Células T Normalmente Secretadas y Expresadas) producidas por las PSC, contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias(140).Las PSC también expresan moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1) que contribuye al reclutamiento de células inflamatorias(141).

La fractalquina (FKN) es el único miembro de la subfamilia de quimioquinas CX3C, que fue identificada por primera vez en el año 1997(142). Se expresa en la

superficie celular y puede ser escindido y convertirse en un quimioatrayente soluble, lo que la convierte en la única quimioquina que posee dos funciones biológicas(142). Como forma soluble actúa como quimioatrayente y recluta células que expresan el receptor de CX3CR1, como los monocitos o las células NK, mientras que unida a la membrana actúa como molécula de adhesión. Se expresa en varios tipos celulares, entre ellas en PSC, aunque su expresión en el páncreas no es exclusiva de las PSC sino que también se puede expresar por células acinares e islotes de Langerhans(143). Las citoquinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  y toxinas como los lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS) inducen la secreción de FKN(144).

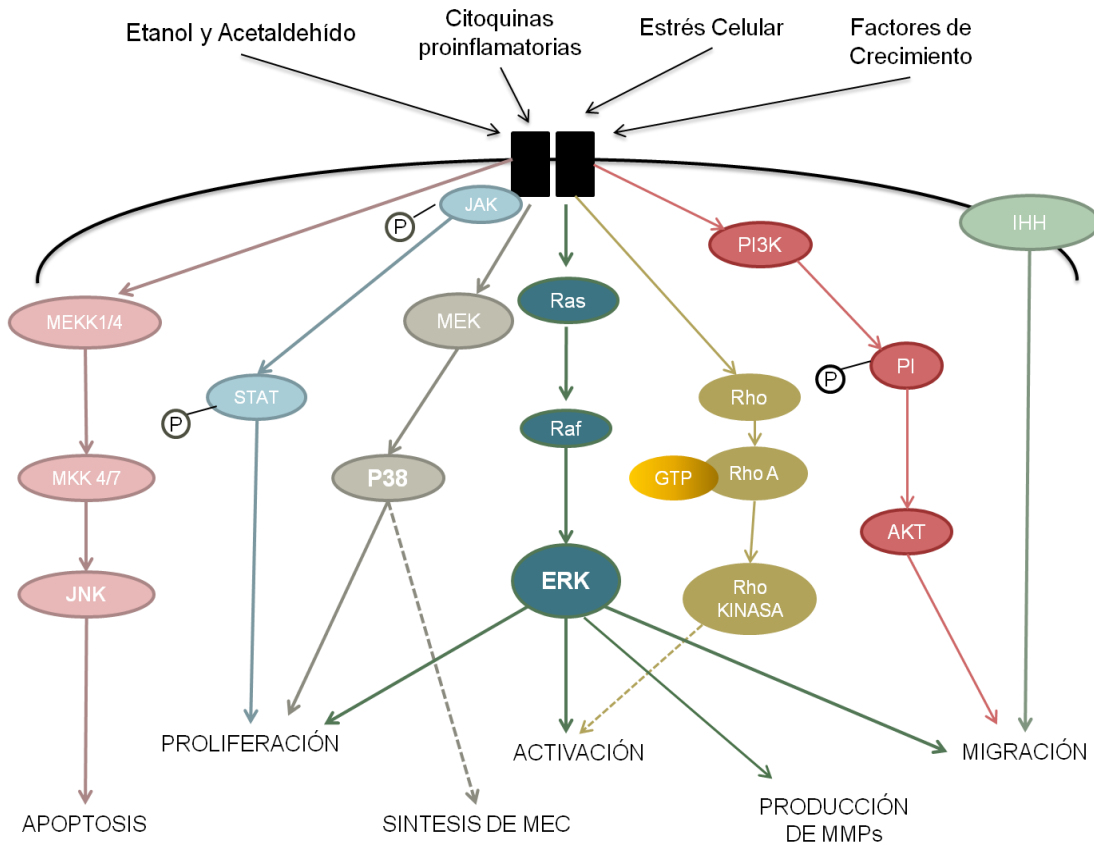
Se ha encontrado que pacientes con pancreatitis crónica tienen niveles elevados de fractalquina en sangre (143,145) que están además implicados en la patogénesis y desarrollo del daño multiorgánico durante la PA grave; por lo tanto podría utilizarse como marcados en etapas tempranas de la PA y PC(146).

#### 7.8. Rutas de señalización en células estrelladas pancreáticas

La identificación de las rutas de señalización intracelulares implicadas en la función de las PSC ha cobrado gran importancia en los últimos años. Identificando las rutas que controlan las funciones de las PSC, se podría regular su función y así progresar en la búsqueda de posibles estrategias terapéuticas (Figura 8).

Una de las principales rutas de señalización que se activan en las PSC es la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Es una familia de proteínas con actividad serin/treonin quinasa específica que tiene un papel fundamental en la regulación de los procesos celulares, incluidos expresión génica, proliferación y supervivencia o apoptosis celular(147). Existen tres rutas principales en mamíferos de la familia de las MAPK: ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), JNK (c-Jun N- terminal quinasa) y p38(147). Concretamente en el páncreas son los elementos centrales que procesan las señales generadas por factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias, TLR ligandos, angiotensina II, etanol, tripsina y estrés oxidativo. Cada miembro de esta familia se activa por fosforilación y se transloca al núcleo donde fosforila y activa factores de transcripción como el NF $\kappa$ B o el AP-1(141,148). Durante la activación de las PSC el NF $\kappa$ B incrementa su actividad y estimula la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, o

citoquinas o quimioquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, MCP-1y CX3CL1 (fractalquina)(141,133,83,144).



**Figura 8.** Esquema representativo de las rutas de señalización implicadas en la activación de las células estrelladas pancreáticas.

La ruta Ras-Raf-ERK1/2 se activa en etapas tempranas y precede al cambio de fenotipo por parte de las PSC(149). El PDGF, el etanol y el acetaldehído estimulan la activación y proliferación de las PSC a través de esta ruta(83). Otra función de PSCs regulada por esta ruta es la producción de MMP-1. Las rutas JNK y p38 se activan en respuesta a citoquinas proinflamatorias y estrés celular además el etanol y sus metabolitos también activan dichas rutas(83), de hecho la inhibición de la actividad enzimática p38 interfiere en la acción activadora del etanol en las PSC. Además el p38 está implicado en el efecto sobre la proliferación de las células estrelladas por parte del PDGF y regula la producción de colágeno en respuesta a

etanol, acetaldehído y estrés oxidativo(150).La ruta JNK está implicada en la inducción de la apoptosis en PSC(151).

Otra ruta de señalización intracelular implicada en los procesos de activación de PSC es la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).Esta ruta es responsable del efecto sobre la migración, y no sobre la proliferación, de PSC tras el estímulo de PDGF(118). Además factores como IL-1 y TNF $\alpha$ , ejercen su acción en las PSC a través de esta ruta. La Rho-Rho quinasa (ROCK)está implicada en la activación *in vitro* ya que regula el citoesqueleto de actina, la formación de fibras y la alteración de la morfología de las PSC durante el proceso de activación(152,127).

Las citoquinas y factores de crecimiento ejercen su efecto en la expresión de genes diana a través de cascadas de señalización que regulan el conjunto de factores de transcripción. Entre los reguladores de la proliferación de PSC promovida por PDGF, están las rutas ERK y JAK/STAT(153). El TGF $\beta$ 1 regula gran variedad de funciones en las PSC, entre ellas incrementa proteínas de matriz extracelular, incrementa la expresión de  $\alpha$ -SMA, regula la proliferación y disminuye la expresión de MMP-3 y MMP-9, a través de los mediadores de señalización intracelular Smad 2 y 3, o por vía autocrina, por lo que induce su propia expresión de ARNm mediada por la ruta ERK (154).

Otra ruta asociada a las PSC es Indian hedgehog (IHH), que incrementa la migración de las PSC de manera quimiotáctica o quimocinética, pero no altera la expresión de  $\alpha$ -SMA, proliferación celular o expresión de colágeno I(155).

En condiciones de hipoxia el factor inducible por hipoxia (HIF-1) se acumula, se transloca al núcleo y transactiva genes como el del factor de crecimiento, VEGF(139).

Finalmente los micro ARNs (ARNmi) han cobrado gran importancia en los últimos años. Son secuencias pequeñas entre 20-25 nucleótidos, no codificantes de ARN, que se dirigen a la región 3' no traducida de ARN mensajero para su desestabilización. Cumplen una serie de funciones, entre ellas se ha descrito su implicación en la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación y la carcinogénesis. Se ha visto que en estado activado existe una gran alteración del

perfil de ARNm comparados con las PSC en estado quiescente, y que estos ARNm alterados están asociados con el movimiento celular, crecimiento y la muerte sugiriendo además que tienen un papel fundamental en la activación de las PSC(137).

#### 7.9. Interacciones con otros tipos celulares.

Las PSC interactúan con otros tipos celulares del páncreas a través de citoquinas y factores de crecimiento. En los últimos años, se ha comprobado que las PSC expresan una gran variedad de conexinas que podrían ser las responsables de la comunicación de las PSC con otros tipos celulares. Las conexinas son subunidades de las uniones estrechas que permiten la comunicación intracelular directa, pero también juegan un papel importante en la regulación de la proliferación celular, en la diferenciación celular y en el desarrollo del tejido; por lo tanto, además de llevar a cabo la comunicación intracelular podrían tener un papel en la regulación de las funciones y la activación de las PSC(156).

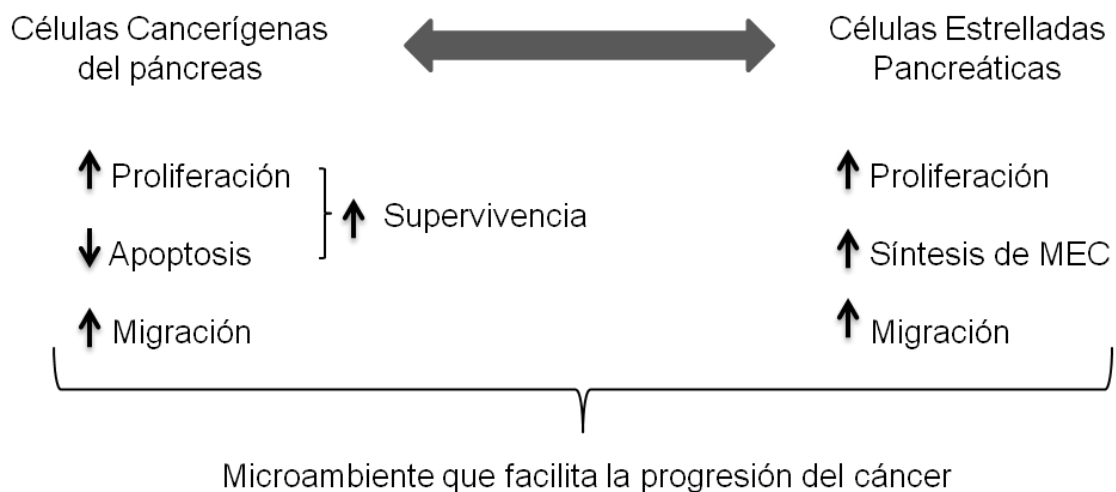
Como ya se ha indicado, las PSC tienen una estrecha relación con las células acinares debido a su localización. Los acinos secretan citoquinas y factores de crecimiento que ejercen su efecto sobre las PSC(81); de esta forma las PSC podrían tener un papel intermediario en la regulación de la secreción de enzimas pancreáticas, concretamente en la secreción de amilasa(135,136).

Con respecto a las células  $\beta$ , las PSC disminuyen la expresión de ARNm de insulina y la secreción de esta hormona por parte de las células  $\beta$ . Además induce la apoptosis de las mismas, estos procesos son característicos de la diabetes mellitus(157).

##### 7.9.1. Interacciones con células cancerígenas

El adenocarcinoma ductal pancreático se caracteriza por una reacción desmoplásica abundante. Las PSC son la principal fuente de proteínas de matriz extracelular que constituyen la desmoplasia(158). Las PSC interactúan con las células cancerígenas y promueven la progresión de la enfermedad a través de múltiples mecanismos, incrementando la proliferación, la migración, la angiogénesis y la metástasis; además protege a las células cancerígenas a los efectos del

tratamiento con gencitabina y radiación (Figura 9). Las PSC promueven la transición epitelio-mesénquima (EMT, siglas en inglés) en células cancerígenas de forma que disminuyen la expresión de marcadores epiteliales (E-caderina) e incrementan la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina y Snail)(159). La EMT es un proceso que permite a una célula epitelial someterse a múltiples cambios bioquímicos y adquirir el fenotipo de célula mesenquimal. El fenotipo EMT conlleva el incremento de capacidad migratoria, incremento de invasividad, elevada resistencia a la apoptosis e incremento de la síntesis de matriz extracelular. Se considera un proceso importante en la progresión de cáncer por la adquisición de capacidad invasiva de las células y las propiedades metastásicas así como la resistencia a quimioterápicos(160).



**Figura 9. Interacción bidireccional entre PSC y células pancreáticas cancerígenas.** Modificado de Apte y colaboradores, 2012 (161).

Por otra parte se observó que las PSC incrementan el fenotipo de célula madre de las células cancerígenas con un aumento de expresión de marcadores específicos de este tipo celular (nestina o ABCG2) en líneas celulares cancerígenas en co-cultivo con PSC(162). En estudios *in vivo* se ha visto que las PSC incrementan la tumorigenicidad, sugiriendo que las PSC podrían también estar implicadas en la formación del nicho para las células madre cancerígenas(163).

Por último, mencionar el papel de las PSC dentro del contexto de la neo-angiogénesis, característica de tumores malignos. Se ha descrito que las PSC estimulan la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento VEGF, y que este proceso se incrementa en condiciones de hipoxia. Además la hipoxia aumenta a su vez la síntesis de proteínas de MEC por parte de las PSC(139).

## **8. El Papel de los Tóxicos en el Páncreas**

### **8.1. El alcohol**

Desde hace años se ha considerado al alcohol la principal causa de pancreatitis, tanto aguda como crónica. Durante las últimas décadas han surgido numerosas teorías centradas en el mecanismo por el cual el alcohol produce daño en el páncreas. De forma general se considera que el alcohol es un factor que contribuye al inicio y progresión (potencialmente reversible) de daño pancreático, pero que por sí sólo no causaría pancreatitis, a no ser que estuviese acompañado de otro factor que puede ser tanto genético como ambiental.

Las primeras investigaciones sobre el alcohol se centraron en los efectos del alcohol sobre los ductos pancreáticos, ya que, en los pacientes con PC de origen alcohólico, existe una tendencia de formar precipitados en el jugo pancreático. La precipitación de proteínas secretadas darían lugar a calcificaciones intraductales; este hecho conllevaría el desarrollo de atrofia acinar y fibrosis(164,165,166).

En los últimos años, los estudios se han focalizado en la capacidad de las células del páncreas para metabolizar el alcohol, y el efecto de sus metabolitos sobre las células pancreáticas, basándose en el conocimiento previo sobre la toxicidad de los productos de metabolización del etanol en otros órganos como el hígado.

Se ha encontrado que en el páncreas existen tres rutas de metabolismo del etanol. Dos por la vía oxidativa y una por la vía no-oxidativa.

- Ruta de metabolización oxidativa:

La principal ruta de metabolización del etanol es a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) presente, principalmente, en el citosol de células acinares. Por esta ruta, el etanol es oxidado a acetaldehído y acetato. La segunda vía oxidativa se lleva a cabo por la acción del citocromo P4502E1 (CYP2E1), dando lugar a acetaldehído en el retículo endoplasmático. CYP2E1 incrementa su expresión en el páncreas con el consumo crónico de alcohol(167). En menor medida, la catalasa de los peroxisomas también puede contribuir al metabolismo de este tóxico. Como resultado de la vía oxidativa del metabolismo del etanol se generan grandes cantidades de ROS(168)y por otro lado la depleción del glutatión pancreático generando un desequilibrio que lleva a estrés oxidativo.

El acetaldehído inhibe la secreción de las células acinares a través de la vía de disfunción microtubular y desorganización de los filamentos de actina (por lo que se inhibe la exocitosis) o por el bloqueo de la unión de los secretagogos a los receptores(169). Por otro lado contribuye al daño de células acinares a través de la reducción del ratio NAD/NADH que conlleva un desequilibrio del estado redox de la célula. Tanto en estudios clínicos como experimentales se ha demostrado que el consumo de alcohol crónico induce el daño celular a través del incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que juega un papel fundamental en la desestabilización de los gránulos de zimógeno y lisosomas(170,171).

- Ruta de metabolización no-oxidativa:

Por otra parte el etanol puede ser metabolizado por vía no oxidativa, mediante la esterificación con ácidos grasos dando lugar a etil-esteres de ácidos grasos (FAEE). Esta reacción está catalizada por etil-esteres de ácidos grasos sintasas (FAEE sintasas). La actividad de FAEE sintasa en el páncreas es mayor que la observada en el hígado(81,172).

Los FAEE son capaces de producir daño en el páncreas produciendo edema pancreático, vacualización acinar, activación del tripsinógeno, incremento de  $Ca^{++}$ (produciendo necrosis celular)(55) y están implicados en la fibrosis inducida por alcohol ya que incrementa la expresión de proteínas de matriz extracelular. Se han propuesto tres vías por las que FAEE causa daño pancreático. Por un lado, los

FAEE puede interactuar directamente con las membranas celulares o por estimulación de la síntesis de esteres de colesterol desestabilizando las membranas, y dando lugar a necrosis celular(173). Por otro lado, a través de ácidos grasos libres liberados durante la hidrólisis de FAEE; en este caso, se estimula los receptores de inositol-3-fosfato (IP3) que incrementa la liberación de  $Ca^{+2}$  almacenado, que lleva a la despolarización de la membrana mitocondrial y con ello la imposibilidad de producir ATP(174).

Se ha observado que para la misma concentración de alcohol, los niveles de acetato (productos de la oxidación del alcohol) son significativamente más altos que los niveles de FAEE (productos de la vía no oxidativa).

Tanto acetaldehído como FAEEs alteran la expresión de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B o AP-1 que median la expresión de moléculas inflamatorias(172). Por otra parte, se sabe que la gravedad de la pancreatitis es directamente proporcional a la cantidad de necrosis celular e inversamente proporcional a la de apoptosis; así el consumo de alcohol incrementa la cantidad de necrosis y disminuye la de apoptosis(175,176,177).

En el páncreas se produce la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR-“Unfolded Protein Response”) como mecanismo adaptativo a la toxicidad del consumo de alcohol crónico. Esta respuesta engloba diferentes procesos, entre ellos, la estimulación de la producción de chaperonas, el incremento del plegamiento y la capacidad de exportar proteínas del retículo endoplasmático (ER), y la eliminación de proteínas aberrantes. Un fallo en el UPR produce estrés celular grave, respuesta inflamatoria y en último término, induce muerte celular(178).

#### 8.1.1. El alcohol en las células estrelladas pancreáticas

Durante el daño pancreático las células estrelladas se pueden activar en respuesta al alcohol(82,83) o por citoquinas proinflamatorias que son liberadas durante la necroinflamación producida por el alcohol o por estrés oxidativo(8).

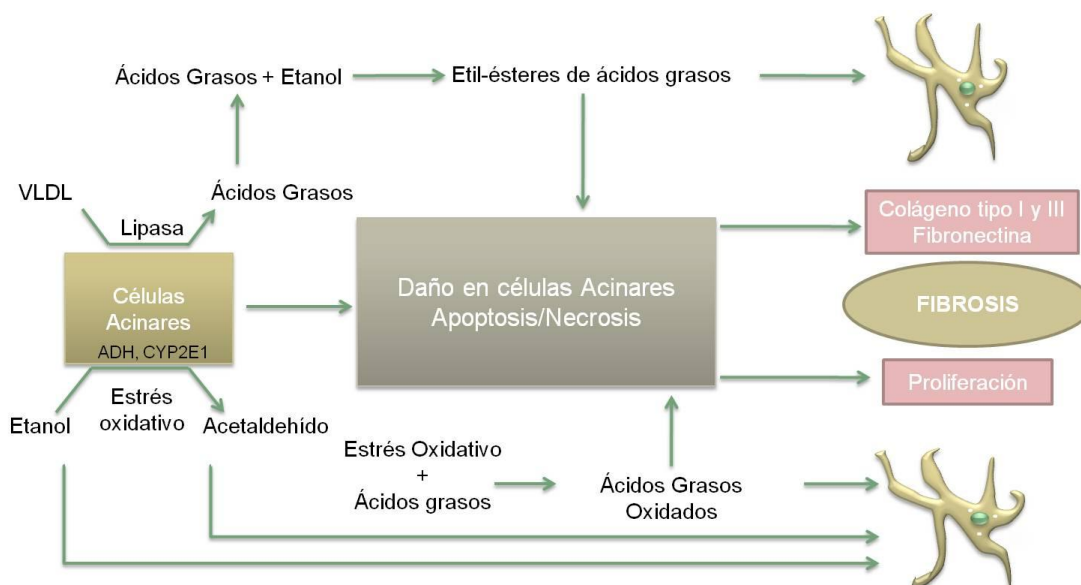
Se ha sugerido que las PSC tienen la capacidad de metabolizar el alcohol por vía oxidativa, ya que presentan actividad ADH (concretamente ADH1C en PSC quiescentes humanas)(179). Está demostrado que el alcohol en cultivo celular, a

concentraciones clínicamente relevantes de 10mM (corresponde con un bebedor social) y 50mM (corresponde con un bebedor crónico)(180), es capaz de activar directamente las células estrelladas pancreáticas, tanto humanas como de rata(83)(82) sin ser necesario una pre-activación de las células para que el alcohol ejerza su efecto estimulante(82). Sin embargo, se ha observado que el efecto sobre la activación de PSC está mediada por el metabolismo del alcohol, más que por el alcohol per se(82).

Tanto el etanol como sus metabolitos inducen la producción de colágeno I, incrementan la secreción de MMP2, estimulan la síntesis de citoquinas (IL-8) y/o factores de crecimiento por parte de las PSC(81,82,83). Las citoquinas endógenas pueden activar los propios receptores de membranas de las PSC por vía autocrina y perpetuar la activación de PSC. Además el alcohol inhibe la apoptosis de las PSC, lo que facilita la supervivencia del fenotipo activado de las PSC en el páncreas(181).

El metabolismo del alcohol (etanol y acetaldehído) produce estrés oxidativo en las células que conlleva a la activación de las mismas, y esta activación es posible inhibirla en presencia de antioxidantes (vitamina A o polifenoles del té verde)(113,182). Es importante destacar que el etanol incrementa la proliferación de las PSC por aumento de la actividad oxidasa del NADPH inducida por PDGF(123).

Por otra parte se sabe que en alcohólicos existe un incremento de la permeabilidad del intestino que permite la translocación de bacterias gram+ a través de la barrera mucosa del mismo de forma que endotoxinas bacterianas, tal como lipopolisacáridos (LPS) de pared, entran en circulación. En otros órganos, como pulmones o hígado, los LPS de pared bacteriana producen daños en la microcirculación, promueven la secreción de citoquinas e inducen estrés oxidativo(175). Se han realizado estudios en el páncreas de animales de experimentación, donde se ha observado que ratas alimentadas con alcohol e inyectadas con LPS dan lugar a daño progresivo del páncreas que conduce al desarrollo de fibrosis a través de vacuolización y necrosis de las células acinares, así como edema pancreático, infiltrado inflamatorio y hemorragia. Además tienen un efecto sinérgico con el alcohol en la activación y la inhibición de la apoptosis en PSC(104) (Figura 10).



**Figura 10. Esquema representativo de los efectos de etanol y sus metabolitos en el páncreas.** ADH, alcoholdehidrogenasa; VLDL, *very-low density lipoproteins*; CYP2E1, citocromo P4502E. Extraído de Bachem y colaboradores, 2006(81).

## 8.2. El tabaco

El tabaco contiene aproximadamente 5000 sustancias, de las cuales por los menos 100 son consideradas carcinogénicas, co-carcinogénicas mutagénicas o promotoras de tumores(183). Metabolitos del tabaco como las N-nitrosaminas(4-metilnitrosamina-1-3-piridil-1-butanona (NNK), N-Nitrosornicotina (NNN) y N-Nitrosodietilamina (DEN)) e hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos, se conocen como los principales carcinógenos del tabaco, aunque otros constituyentes del tabaco, como los elevados niveles de radicales libres, pueden cumplir un papel fundamental en la toxicidad del mismo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tabaco mata a casi 6 millones de personas al año, de las cuales más de 5 millones lo consumen o lo han consumido, y más de 600.000 son personas no fumadoras expuestas al humo ambiental por lo que considera al tabaco como un carcinógeno de clase 1 (existe evidencias de su efecto carcinógeno en humanos).

El humo del tabaco se puede diferenciar en dos fases: la fase alquitrán, o de partículas sólidas (fase estable), se define como el material retenido cuando la

columna de humo pasa a través de un filtro de fibra de vidrio tipo Cambridge (filtro para humo de tabaco) que retiene el 99.9% de las partículas sólidas. La fase gas (fase transitoria), es el material que pasa a través del filtro. Ambas fases contienen elevadas concentraciones de especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico, peróxido nítrico y radicales libres de compuestos orgánicos(184).

La nicotina es un agonista de la familia de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) que se expresa en la mayoría de las células de mamífero. La afinidad de la nicotina por estos receptores es mayor que la de la propia acetilcolina(185). El resultado de la hiperestimulación de las rutas de señalización de los receptores nicotínicos es el responsable de los efectos de la nicotina en el organismo.

Las nitrosaminas, NNK, NNN y DEN, se convierten mediante una vía oxidativa en metabolitos que tienen la capacidad de unión a la molécula de ADN formando aductos que están asociados con la activación de K-ras y la inactivación de p53, estos dos puntos están asociados a numerosos cánceres humanos. Concretamente el NNK tiene una gran afinidad a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos 1 y 2 ( $\beta$ 1R y  $\beta$ 2R) y al receptor  $\alpha$ 7 nicotin-acetilcolina ( $\alpha$ 7nAChR). Además el  $\alpha$ 7nAChR está sobreexpresado en pacientes fumadores y en animales de experimentación en páncreas y en pulmón tras la exposición a nicotina y NNK(186).

Desde hace más de 40 años se conoce que el tabaco es un factor de riesgo para el cáncer de páncreas(187,23); de hecho, está relacionado con el 25% de los casos de cáncer y el riesgo aumenta con la duración y la cantidad de tabaco consumida(188). Por otra parte el cese del hábito tabáquico disminuye el riesgo de desarrollar cáncer hasta igualarlo a la población general entre los 5-10 años posteriores(189), con una reducción inicial del 50% en los dos primeros años de abstinencia(190). Numerosos estudios, pero no todos, han demostrado que existe una asociación entre tabaco y el riesgo de desarrollar pancreatitis crónica; además esta asociación se incrementa de una forma dosis dependiente(191,24). Aunque se observó interacción significativa entre alcohol y tabaco, si se observó una tendencia de un efecto sinérgico entre ambos tóxicos en pacientes con pancreatitis crónica(24,192). Además el tabaco se asocia a la progresión de la pancreatitis crónica. De esta forma incrementa el riesgo de desarrollar calcificaciones(193,29,194), insuficiencia pancreática exocrina(193) y diabetes(29).

Además en pacientes fumadores el inicio de la enfermedad ocurre 5 años antes comparados con los no-fumadores(29).

Existen modelos animales para el estudio de los efectos del tabaco en el inicio y progresión de la pancreatitis crónica. En uno de los modelos experimentales utilizados someten a las ratas a altas dosis de tabaco (1R4F- tabaco para investigación), durante 12 semanas. Tras la exposición a altas dosis de tabaco ( $160\text{mg}/\text{m}^3$ ), el páncreas presentaba áreas de inflamación con reducción del número de células acinares e incremento de deposición de matriz extracelular, distribuidos por toda la glándula. Además la expresión y secreción de tripsinógeno y quimiotripsinógeno se encontraba incrementada mientras que la actividad de tripsina intrapancreática estaba reducida de una forma dosis-dependiente(195). Sin embargo, el daño pancreático era menor que en un paciente con pancreatitis crónica, esto puede ser debido al corto periodo de tiempo de exposición al tóxico. La exposición a los cigarrillos fue monitorizada mediante la determinación de cotinina en sangre. La cotinina es un producto de metabolización de la nicotina, de hecho, entre el 70-80% de la nicotina se metaboliza a cotinina. La cotinina no sólo fue encontrada en sangre de las ratas sino también en el páncreas. Otros estudios se han centrado en el efecto de la nicotina (administrada mediante aerosoles, de forma intragástrico o por alimentación ad libitum). En estos estudios, las células acinares mostraban núcleos picnóticos, fenómenos de vacualización, cambios en la morfología citoplasmática y disminución de la respuesta secretora de las mismas(196,197).

#### 8.2.1. El tabaco y la fibrogénesis

Aunque el efecto del tabaco en la fibrogénesis pancreática aún no ha sido estudiado, existen numerosos trabajos donde se ha estudiado el efecto de la nicotina en los mecanismos implicados en este proceso en otros órganos. Hasta la fecha se ha relacionado la nicotina con la fibrogénesis en el corazón, riñón, pulmones y actualmente el hígado. Los efectos de la nicotina de los estudios *in vitro* han corroborado los efectos en modelos animales. En modelos *in vivo* se ha visto que la nicotina incrementa los niveles de catecolaminas circulantes y otras hormonas que pueden tener consecuencias en numerosos órganos(198).

La nicotina promueve daño en las células endoteliales o epiteliales, dan lugar a una respuesta inflamatoria que contribuye al daño celular(199). Se ha propuesto que el efecto en el endotelio es debido a alteraciones en la conductancia de iones como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ (199). Concretamente en el tracto gastrointestinal, la nicotina incrementa el número de eosinófilos en la lámina propia, produce edema e incrementa el daño en las células basales(199). Por otra parte estimula la expresión de marcadores de estrés oxidativo y aumenta la activación de las rutas de señalización implicadas en fibrogénesis y en inflamación(200). Además incrementa la expresión de marcadores del proceso de transición epitelio-mesénquima en el epitelio renal(201).

La nicotina estimula la producción y secreción del factor de crecimiento  $\text{TGF}\beta$ , que está implicado en el proceso de reparación tisular y en diferenciación de muchos tipos celulares. Juega un papel fundamental en la regulación de la fibrosis. Numerosos modelos in vivo de fibrosis han demostrado que la nicotina se une al receptor  $\alpha 7\text{-nAChR}$  (202) que es el responsable de la activación de los fibroblastos presentes en el tejido a través de micro ARNs dependientes de la regulación de la ruta de  $\text{TGF}\beta$ (203). Un estudio in vivo en riñón de ratón observó que la nicotina incrementa la expresión de  $\text{TGF}\beta 1$  responsable de la reorganización de F-actina, la expresión de vimentina, fibronectina y  $\alpha\text{-SMA}$ (200). También se estudió el efecto de la nicotina en HSC, se comprobó que la nicotina incrementa la síntesis de colágeno y el  $\text{TGF}\beta$  en hígado(202).

El reclutamiento de células inflamatorias es un proceso clave en la fibrogénesis. Numerosos estudios han confirmado el papel de la nicotina en la activación del reclutamiento de células inflamatorias. Concretamente, neutrófilos, macrófagos, y linfocitos responden a un tratamiento con nicotina dependiendo de la dosis(204,205), ya que a altas concentraciones el efecto quimioatrayente se bloquea(206). Otros estudios han demostrado que la nicotina incrementa además, la expresión de IL-8 que a su vez actúa atrayendo células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos(207).

Por otra parte la nicotina induce estrés oxidativo en diferentes tipos de células, entre ellas epiteliales, macrófagos, células hepáticas grasas y células mesangiales. Los mecanismos de producción de ROS van a tener diferentes mediadores dependiendo del tipo celular. En el hígado la producción de ROS está asociada al

proceso de peroxidación lipídica (208) o por disminución de la actividad antioxidante del glutatión peroxidasa, catalasa o superóxido dismutasa; esto ocurre también en los macrófagos(205,208).

Finalmente se ha observado que el tabaco contribuye a la fibrosis en otros órganos como el corazón, por incremento de la deposición de colágeno vía fibroblastos(209,210). Otros estudios han comprobado que la nicotina incrementa la producción de colágeno y la activación de los fibroblastos (incrementa la expresión de  $\alpha$ -SMA) *in vitro* en varios tipos celulares, células cardíacas(210), de pulmón(211), próstata(212), de la encía (213) y de las articulaciones(214). En el corazón además de la producción de colágeno incrementa la tasa de proliferación de los fibroblastos(203). En cáncer gástrico, la nicotina altera la morfogénesis y la diferenciación de los fibroblastos locales(215).

Aunque, como se ha explicado, diversos estudios epidemiológicos han relacionado la incidencia de la pancreatitis crónica con el tabaco, estudios experimentales preliminares se han centrado en el efecto de la nicotina o de otros co-carcinogénicos presentes de forma independiente, debido a la heterogénea composición del tabaco. No obstante, muchos componentes químicos pueden interactuar entre ellos produciendo un efecto sinérgico en su acción. Por otra parte, aunque el alcohol está clásicamente asociado a pancreatitis crónica, los factores alcohol y tabaco suelen aparecer juntos en pacientes con esta patología; por lo tanto el alcohol podría actuar como factor de confusión(216).

## *2. Hipótesis*



# Hipótesis

---

El tabaco de manera sinérgica con el alcohol o de forma independiente, estimula el desarrollo de los procesos asociados con la fibrogénesis del páncreas, ejerciendo su efecto a través de las células estrelladas pancreáticas. Concretamente el tabaco estimula la activación de las células estrelladas pancreáticas que conlleva la transdiferenciación morfológica, la proliferación, la migración y la estimulación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular y de moléculas proinflamatorias por parte de las PSC. Estos procesos están promovidos por el incremento de especies reactivas del oxígeno dentro de la propia célula estrellada.



### ***3. Objetivos***



# Objetivos

---

Objetivo general:

Estudiar el papel del tabaco en los procesos asociados a la fibrosis pancreática mediado por las células estrelladas del páncreas.

Objetivos específicos:

1. Optimizar el aislamiento de células estrelladas de páncreas proveniente de páncreas de rata con el fin de obtener un número adecuado de células y caracterizar las células en cultivo.
2. Estudiar el efecto del tabaco sobre la citotoxicidad y la proliferación de células estrelladas pancreáticas como proceso fundamental en la fibrogénesis pancreática.
3. Estudiar la transdiferenciación de las células estrelladas como marcador del inicio del proceso de activación celular.
4. Estudiar la migración de las células estrelladas pancreáticas como un proceso fundamental en la fibrogénesis pancreática.
5. Cuantificar la expresión de proteínas de matriz extracelular como marcadores del desarrollo de fibrosis.
6. Cuantificar la liberación de moléculas inflamatorias e inductoras de fibrosis.
7. Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno como posibles efectores de la activación de las células estrelladas pancreáticas.



## *4. Materiales y Métodos*



# Materiales y Métodos

---

## 1. Diseño del estudio

Estudio de investigación traslacional a realizar sobre cultivos de células estrelladas pancreáticas. En cada experimento a realizar se presentarán las siguientes variables:

- a) Control: células cultivadas en medio de cultivo con el vehículo de los tratamientos.
- b) Tratamiento con alcohol: células estimuladas por alcohol a concentraciones crecientes (rango entre 5-100mM).
- c) Tratamiento con tabaco: células donde se administra extracto líquido de tabaco a distintas concentraciones (rango entre 0,01-0,4mg/mL).
- d) Tratamiento con alcohol y tabaco combinado.

Cada experimento se repitió 5 veces a 24 y 48 horas y 3,5 horas en el caso del estudio de especies reactivas del oxígeno (ver apartado de análisis de producción de especies reactivas del oxígeno). Las células utilizadas en cada experimento se sometieron a una incubación previa de 4 horas en un medio libre de suero.

## 2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho *Rattus norvegicus* de la cepa *Sprague Dawley* con un peso comprendido entre 200 y 250 g alimentadas con dieta comercial *Global Diet 2018S* (Harlan, EEUU) esterilizada en autoclave, y con acceso libre a agua también estéril. Los animales fueron suministrados y mantenidos por el Animalario de Producción (Unidad de Experimentación Animal) de la Universidad de Santiago de Compostela, cumpliendo con la normativa impuesta por el Consejo de la Directiva Europea (2010/63/UE) y la legislación española, Real Decreto 53/2013 (antes R.D. 1201/2005) en relación con la protección de animales utilizados para experimentación y con otros fines científicos. Se mantuvieron en jaulas ubicadas en habitaciones termostatazadas a una temperatura de 20-23°C y alternancia de periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

### 3. Tratamientos

#### 3.1. El alcohol

Todos los experimentos se realizaron en presencia de alcohol, ya que se ha demostrado que el alcohol a determinadas concentraciones produce alteraciones directas sobre las células estrelladas, entre ellas, la activación o producción de ROS (82,83). Para ello se utilizó una solución stock de etanol absoluto (Merck KGaA, Alemania) a una concentración de 17,39 M. Previamente se ha descrito que la concentración de alcohol que altera la fisiología de las células estrelladas pancreáticas es 50 mM, sin embargo 5 y 10 mM también se han asociado a algunas alteraciones en estas células(82,83). Las concentraciones elegidas son concentraciones que se consideran clínicamente relevantes. La unidad de bebida estándar (UBE) es una medida establecida por la OMS con el fin de unificar criterios a la hora de calcular el consumo de alcohol. Cada UBE supone entre 8-13g de alcohol puro consumidos, por lo tanto, 10mM de etanol se corresponde aproximadamente de 1 a 2 UBE, (equivaldría a un bebedor moderado), mientras que 50 mM se corresponde aproximadamente a 8 a 10 UBE (equivaldría a un bebedor crónico)(180). Cada una de las diluciones para obtener la concentración final de 5, 10, 50 y 100mM se realizó diluyendo el stock en medio DMEM/F'12.

#### 3.2. El tabaco

El tabaco utilizado es extracto líquido de tabaco (*Cigarette Smoke Condensate*, CSC) preparado por la Universidad de Kentucky (Murty Pharmaceuticals, EEUU). En concreto, este extracto se extrae de cigarrillos estándar para investigación, 3R4F, en una *Smoke Machine FTC* que posee un filtro tipo Cambridge donde se recoge toda la fase sólida de partículas (TPM). La cantidad de TPM se calcula por el incremento de peso del filtro. A continuación se hace un condensado por sonicación y dilución con dimetil sulfóxido (DMSO). Partiendo de una solución stock de 40mg/mL al 4% peso/volumen en DMSO, se ensayaron concentraciones finales de extracto líquido de tabaco a 0,01; 0,1; 0,2 y 0,4 mg/mL basándonos en estudios previos en otros tipos celulares(217,218). Al igual que en el caso del alcohol, las diferentes diluciones se realizaron a partir del stock de tabaco con medio DMEM/F'12.

Se realizó un estudio previo del efecto citotóxico del tabaco sobre las PSCs, con el fin de elegir una concentración no citotóxica de tabaco para la realización del resto de los estudios (ver análisis de citotoxicidad celular).

#### 4. Aislamiento Celular

El método de aislamiento de las células estrelladas pancreáticas del que partimos fue descrito por primera vez por Apte y colaboradores en 1998(17) y modificado posteriormente por Rickmann y colaboradores(115). Este método se basa en las características morfológicas de estas células, que al poseer gránulos lipídicos en su interior, tienen menor densidad que otros tipos celulares pancreáticos. Todo el proceso de aislamiento y mantenimiento se realizó en condiciones de esterilidad en una sala destinada a los cultivos celulares dentro de las instalaciones del Instituto de Investigación Sanitaria del Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela (IDIS).

- Reactivos y materiales para el cultivo:
  - Material de disección: tijeras de disección, pinzas y pinzas kocher
  - Placas petri 100mm (Falcon BD, EEUU)
  - Hielo
  - Oxígeno
  - Matraz de boca ancha (Simax, República Checa)
  - Filtros de nylon 100µm (Falcon BD, EEUU)
  - Tampón Fosfato Salino estéril (PBS) a pH 7,4 que contiene NaCl 136mM, KCl 2mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM.
  - Campana de Flujo Laminar bv-100 (Burdinola, España)
  - Incubador HeraCell 150 (Thermo Scientific, EEUU) a 37°C , 95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>
  - Baño Termostatizado Unitronic Vaivén (P Selecta, España)
  - Centrífuga z383k (Hermle Machine Company, EEUU)
  - Frascos de Cultivo ventilados de 25cm<sup>2</sup> (NUNC, Thermo Scientific, EEUU)

#### Solución de digestión:

- 0,05% Pronasa (Roche Applied Science-Mannheim,Alemania).
- 0,025% Colagenasa P (Roche Applied Science-Mannheim, Alemania).
- 0,025% DNAsa tipo I(AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania).
- 10 mmol/L Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N´-(2-etanosulfónico)[HEPES](Hyclone-Utah, EEUU).
- 0,01% Inhibidor de tripsina (Sigma Aldrich- Steinheim, Alemania).
- *Hanks' balanced salt solution* [HBSS] (PAA Laboratories GmbH- Pasching, Austria).

Se prepararon 20 mL totales de solución fresca por cada páncreas, que se mantuvieron a temperatura ambiente y se oxigenaron durante un minuto sin hacer burbujas.

#### Solución de lavado:

- *Hanks' balanced salt solution* [HBSS](PAA Laboratories GmbH- Pasching, Austria).
- 7,5% de Suero de Albumina Bovino (BSA) fracción V estéril (AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania).
- 0,0125% de DNAsa tipo I (AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania).

#### Solución para hacer el gradiente de densidad:

- *Hanks' balanced salt solution* [HBSS](PAA Laboratories GmbH- Pasching, Austria).
- *Optiprep Density Gradient Medium*12%(Sigma Aldrich- Steinheim, Alemania).

#### Medio completo para cultivo:

- DMEM/F'12 con glutamina estable (PAA Laboratories GmbH-Pasching, Austria).
- 15 mmol/LÁcido N-(2-hidroxietil) piperazin-N´-(2-etanosulfónico)[HEPES](Hyclone-Utah, EEUU)

- Estreptomycin 100mg/mL y Penicilina 100U/μl (PAA Laboratories GmbH-Pasching, Austria).
- 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) estéril, inactivado por calor (56°C, 30 minutos) (PAA Laboratories GmbH-Pasching, Austria).

#### 4.1. Obtención de células

Tras el sacrificio del animal con CO<sub>2</sub> en una cámara destinada para tal fin, se procedió al lavado del animal por la zona abdominal con alcohol 70%, se abrió la cavidad peritoneal y se extrajo el páncreas. Una vez extraído, el páncreas se lavó con PBS 1x pre-enfriado estéril en hielo y se eliminan los restos de grasa y ganglios adheridos.

La disección del páncreas se realizó en un matraz de boca ancha, junto con la solución de digestión previamente oxigenada, con unas tijeras para mejorar la actividad de la colagenasa P; a continuación se volvió a oxigenar el tejido. Se introdujo el tejido en un baño termostático durante 12 minutos con agitación a 37°C, y pasado ese tiempo, se procedió a la digestión mecánica con diferentes tamaños de puntas de pipeta (este proceso nunca excedió los 10 minutos). A continuación se pasó el tejido por un filtro de nylon de 100μm para eliminar todas aquellas células que tengan un tamaño superior como los acinos pancreáticos e islotes de Langerhans. Después se realizó un lavado con 10 mL de HBSS con el fin de limpiar bien el matraz de células.

A continuación la digestión se centrifugó a 300 g durante 5 minutos para obtener el pellet celular. Se lavó con solución de lavado para eliminar posibles restos de la solución de digestión, y se volvió a centrifugar (300g, 5 minutos).

Para la obtención de las células estrelladas pancreáticas se hizo un gradiente de densidad con *Optiprep Density Gradient Medium* 12% con HBSS y la suspensión celular (Figura 11). Se añadieron lentamente 3 mL de HBSS sobre la suspensión de Optiprep para hacer una capa de solución acuosa evitando que se mezclen las dos capas. Se centrifugó el gradiente 12 minutos a 1400g sin freno. Se resuspendió la interfase donde se encuentran las células estrelladas en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB, y se centrifugó durante 5 minutos a 300g. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo completo.

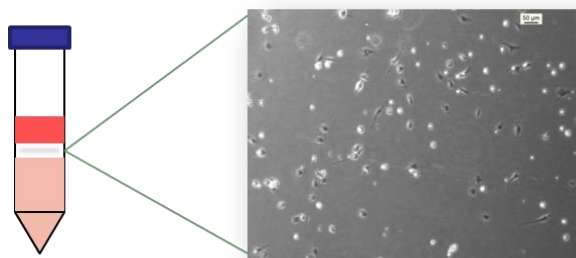


Figura 11. Representación del gradiente de densidad de la suspensión celular de PSC.

## 5. Tipos de cultivo

### 5.1. Cultivo primario

Para el cultivo primario de las PSC, las células aisladas provenientes de un páncreas de ratase sembraron en un frasco de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con 5 mL de medio completo. A las 24 horas del aislamiento se realizó un cambio total de medio para eliminar posibles contaminantes. Se dejaron crecer hasta la confluencia en medio DMEM/F'12 suplementado con 10% SFB previamente inactivado por calor (56°C durante 30 minutos) y conteniendo HEPES y antibióticos (estreptomomicina y penicilina) (Figura 12). Los cultivos se mantuvieron en un incubador para células, en una atmósfera estéril. En cada subestudio se utilizaron las células en el primer o segundo pase; las condiciones específicas de cada uno de ellos serán explicadas en cada apartado.

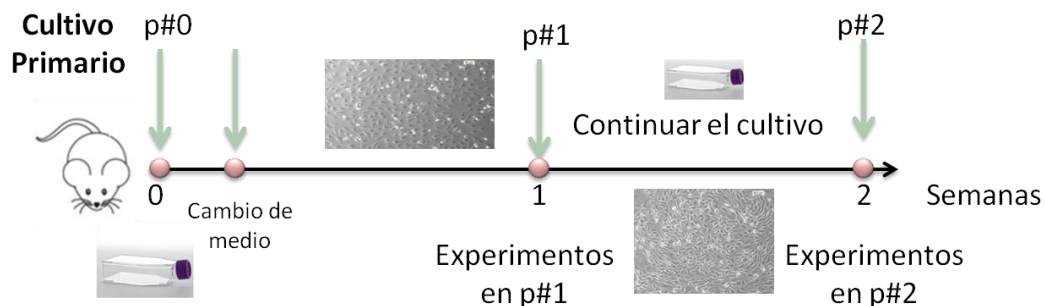
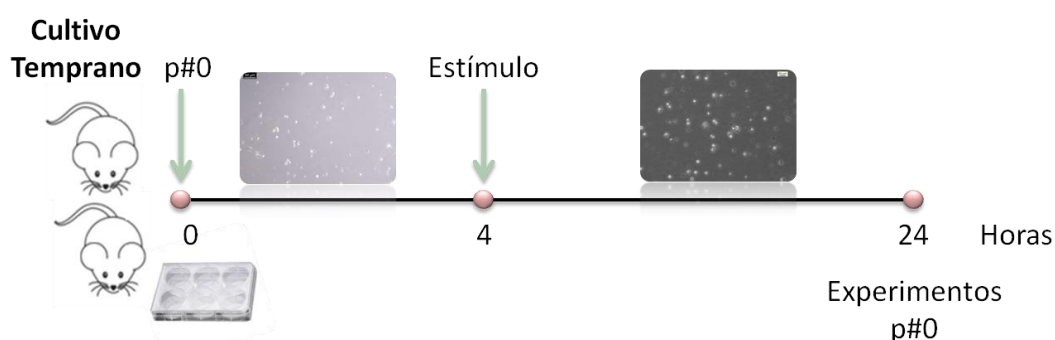


Figura 12. Esquema cultivo primario de PSC

## 5.2. Cultivo temprano

Para los estudios de activación de las células estrelladas pancreáticas se realizó un cultivo temprano(82) con el fin de eliminar en mayor medida el efecto del plástico y de las propias células sobre la expresión del marcador del cambio de fenotipo actina alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Para ello se aislaron las células provenientes de dos páncreas de rata como se indica en el apartado de aislamiento, y una vez aisladas (pase 0: p#0) se sembraron en una placa de 6 pocillos en medio DMEM/F'12 suplementado con 10% SFB previamente inactivado por calor y conteniendo HEPES y antibióticos (estreptomicina y penicilina).

Una vez sembradas, se dejaron en cultivo durante 4 horas con medio completo para añadir a continuación los diferentes estímulos (Figura 13).



**Figura 13. Esquema cultivo temprano de PSC.** (p#0: células recién aisladas).

### 5.2.1. Mantenimiento del cultivo

Las PSC llegan a la confluencia (90-100%) aproximadamente tras 5 días en cultivo. Para realizar el cambio (pase) (ver Figura 12), primero se aspiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS1x. Se añadieron 2mL de tripsina-EDTA 0,01% (Hyclone-Utah, EEUU) y se dejó a 37°C durante dos minutos. Transcurrido ese tiempo se añadió medio completo al 10% de SFB, y se recogieron las células en un tubo estéril. Se centrifugaron a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se aspiró el sobrenadante, y se resuspendió el pellet celular en medio

completo al 10% de SFB. Los cultivos de PSC se mantuvieron sólo hasta el segundo pase.

## **6. Caracterización del Cultivo de Células Estrelladas Pancreáticas**

Se diseñaron 2 experimentos para estudiar la concentración, viabilidad celular y pureza del cultivo de las PSC.

Método 1: Se utilizó el método de aislamiento descrito por Rickmann en el año 2007(115), tal y como se describe en el apartado de aislamiento celular.

Método 2: Basándonos en el método anterior, se incrementó el tiempo de digestión en el baño termostático a 37°C, de 12 a 25 minutos en agitación, sin modificar las demás condiciones de aislamiento.

En las mismas condiciones de cultivo que en experimentos anteriores, se evaluó la concentración celular, la viabilidad y la pureza del cultivo para comparar ambos métodos.

### **6.1. Determinación del número de células, viabilidad y pureza del cultivo**

- Reactivos y materiales
  - Cámara de Neubauer o hematocitómetro.
  - Reactivo Azul tripán 0,4% (Sigma Aldrich, Alemania)
  - Microscopio de fluorescenciaespectral AOBS Leica DMIRE2 invertido.

Para el estudio citomorfológico de las células estrelladas pancreáticas se analizó la concentración celular, la viabilidad y la pureza del cultivo. Para la determinación de la concentración celular y viabilidad celular, se hizo una exclusión con azul tripán. A la suspensión celular se le añadió el colorante azul tripán al 0,4%, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación, se realizó el contaje en la cámara de Neubauer aplicando las siguientes formulas:

Concentración Celular

$$= \frac{\text{Células contadas}}{\text{Superficie(mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad de la cámara (mm)} \times \text{Factor de dilución}}$$

$$\text{Viabilidad Celular (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células totales} - \text{N}^\circ \text{ de células muertas}}{\text{N}^\circ \text{ de células Totales}}$$

Para la determinación de la pureza del cultivo se realizó un análisis con el microscopio confocal de fluorescencia determinando la presencia de gránulos de vitamina A dada la autofluorescencia del retinol. Para ello las células recién aisladas se sembraron en una placa con el fondo de cristal, para evitar la dispersión de rayo de luz UV. A continuación se expusieron a la excitación con luz UV (328nm de longitud de onda). Para determinar el porcentaje de pureza del cultivo, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza(\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células totales} - \text{N}^\circ \text{ de células no fluorescentes}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}}$$

## 7. Análisis de Citotoxicidad Celular

### 7.1. Ensayo de actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH)

- Reactivos y materiales
  - *Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup>* (LDH) (Roche Applied Science, Alemania)
  - Placas 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU)
  - Lector de placas VERSAmax (Bionova científica, España)

Con el fin de determinar la toxicidad de las concentraciones elegidas de tabaco para la realización de los posteriores estudios, se realizó un estudio de liberación de lactato deshidrogenasa. Para ello se utilizó un kit de detección de citotoxicidad-LDH

(Roche Applied Science). Este ensayo se basó en la cuantificación de muerte y lisis celular; para ello se mide la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa liberada del citoplasma de las células dañadas. En este ensayo se utilizaron PSC en pase 2, se sembraron 9.000 células por pocillo en placas de 96, que se dejaron durante 24 horas para permitir que se depositen y se peguen a la placa. Transcurrido ese tiempo, se hizo un lavado y se les añadió medio DMEM completado con HEPES y antibióticos sin suero fetal bovino. Pasadas 4 horas, se añadió en cada pocillo el estímulo correspondiente (Tabla 2). Se hizo un control positivo, donde a la suspensión celular se le añadió 5 µl de tampón de lisis proporcionado por la casa comercial una vez que transcurra el tiempo de incubación (24 y 48 horas). El control negativo, fueron células con medio de cultivo sin tratar. Además se hicieron otros tres controles: medio con tabaco sólo, medio con alcohol sólo, y suspensión celular con medio y DMSO (como vehículo para el tabaco). Se dejaron incubar los diferentes estímulos durante 24 y 48 horas en el incubador de cultivos. Transcurrido el tiempo de incubación con los diferentes estímulos, se añadió a cada pocillo 100l de mix reconstituyente proporcionado por la casa comercial. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó la absorbancia utilizando un lector de placas VERSAmax a 490nm de longitud de onda.

Tratamientos	Tabaco					
		0	0,01mg/mL	0,1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
Alcohol	0	Control	T0,01	T0,1	T0,2	T0,4
	5mM	E5	T0,01+E5	T0,1+E5	T0,2+E5	T0,4+E5
	10mM	E10	T0,01+E10	T0,1+E10	T0,2+E10	T0,4+E10
	50mM	E50	T0,01+E50	T0,1+E50	T0,2+E50	T0,4+E50
	100mM	E100	T0,01+E100	T0,1+E100	T0,2+E100	T0,4+E100

**Tabla 2. Esquema de los distintos tratamientos testados en el experimento de citotoxicidad.**

El porcentaje de liberación de LDH de las células se calculó comparando el valor de la absorbancia de las células tratadas con la absorbancia del máximo de liberación de LDH por parte de las células lisadas (control positivo). Para determinar la citotoxicidad producida por ambos tóxicos, se le restó al valor de cada pocillo los valores de absorbancia basales (células sin tratamiento-control negativo). Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{(\text{Valor del pocillo} - \text{Control negativo})}{(\text{Control positivo(lisis)} - \text{Control negativo})} \times 100$$

## 8. Proliferación

El estudio de la proliferación celular se realizó mediante dos métodos: a tiempo final y a tiempo real. El primero se basó en el método de reducción de sales de tetrazolium a formazán en la mitocondria celular (WST-1), donde se comparó la capacidad proliferativa de las PSC en respuesta a tabaco frente a un control negativo y a un tratamiento con alcohol sólo. En el segundo método, monitorizamos las células a tiempo real, con lo que podemos ver los cambios que existen a lo largo de un periodo de tiempo determinado.

### 8.1. Ensayo de Tetrazolium soluble en agua (*Water-Soluble tetrazolium 1*, WST-1)

- Reactivos y materiales
  - *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Roche Applied Science, Alemania)
  - Placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU)
  - Lector de Placas VERSAmax (Bionova Científica, España)

La actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial se determinó utilizando el ensayo WST-1 (Roche Applied Science). Este ensayo se basa en la capacidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de romper las sales de tetrazolium a formazán cuando es metabólicamente activa. Un incremento del número de células viables da lugar a un incremento de la actividad de la enzima que conlleva un incremento de formazán y esto se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas de la muestra. Por la misma razón este método se utiliza para comprobar los resultados del ensayo de citotoxicidad, ya que la ausencia de sales de formazán se correlaciona con células muertas. Al igual que en el ensayo de citotoxicidad mediante LDH, se partió de células en el segundo pase. Concretamente se sembraron 9.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen total de 100µL; se utilizó además un pocillo de medio sin células como blanco. Una vez sembradas, las células se dejaron durante 24 horas en medio

suplementado con suero fetal al 10% con HEPES y antibióticos; una vez transcurrido ese tiempo se hizo un lavado y se sembraron durante 4 horas en medio libre de suero. A continuación se estimularon las células con los diferentes tratamientos por triplicado (ver tabla 2). Tras 24 y 48 horas de incubación con los diferentes tratamientos, se añadieron 10µL del reactivo de proliferación celular WST-1 y se dejaron incubando 4 horas en el incubador para células. A continuación se midió la absorbancia a 440nm de longitud de onda en el espectrofotómetro VERSAmax.

Una vez obtenidos los datos de densidad óptica se hizo una media de las tres medidas por condición. La absorbancia en cada caso se comparó con el control negativo por porcentaje:

$$\text{Proliferación Celular(\%)} = \frac{(\text{Valor de experimento} - \text{Blanco})}{(\text{Control negativo} - \text{Blanco})} \times 100$$

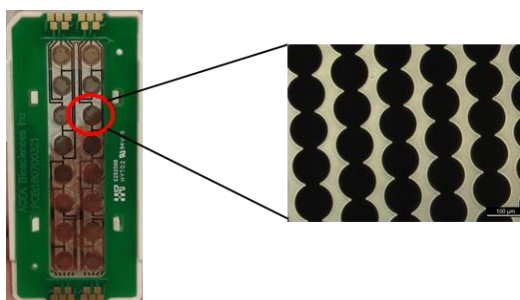
## 8.2. Sistema xCELLigence

El sistema xCELLigence de ACEA Biosciences monitoriza la proliferación y viabilidad celular a tiempo real(219). Este sistema utiliza placas con microelectrodos de oro que analiza de forma no invasiva la viabilidad y proliferación de las células en cultivo en base a la impedancia eléctrica. Las células que están en contacto con el sensor cambian la impedancia eléctrica entre los dos electrodos de oro de cada pocillo, esta lectura da información cualitativa a tiempo real del estado de las células, incluyendo el número de células, la viabilidad y la morfología. En sí misma, la impedancia no determina el número de células, sino que el cambio en la impedancia se recoge como el valor *Cell Index*(CI). De esta forma cuando las células no están unidas al fondo de la placa, el valor CI es cero. Así, un determinado CI se ve alterado al cambiar cualquier condición fisiológica.

- Reactivos y materiales
- Estímulos:
  - Control negativo: Medio sin suero con DMSO.
  - Control alcohol: 50mM de etanol.
  - Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.

- xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, Roche Applied Science, Alemania)
- Placas de monitorización *E-Plate* (Roche Applied Science, Alemania)
- *Software Real Time Cell Analyzer 1.2* (RTCA) (ACEA Bioscience, Roche Applied Science, Alemania)

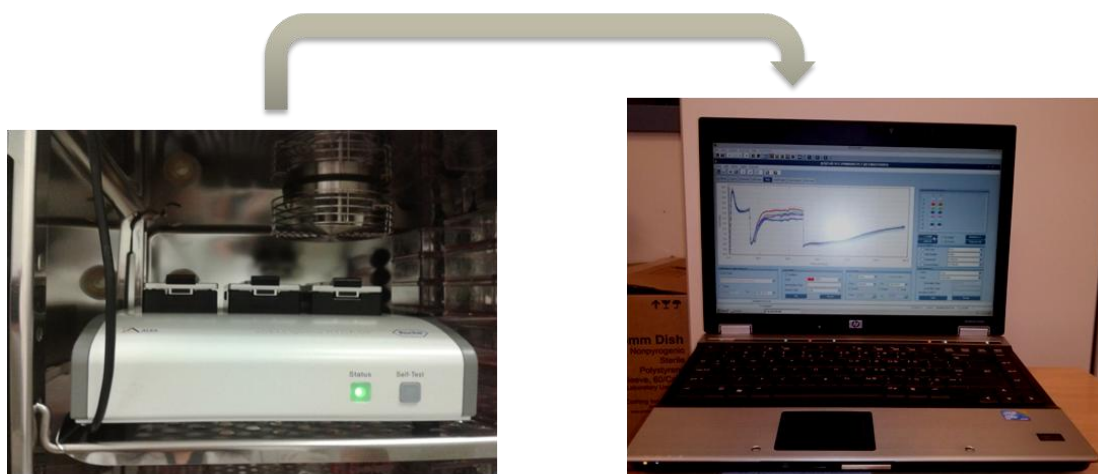
Este método se utilizó para monitorizar la proliferación de las PSC a tiempo real y corroborar los resultados obtenidos por el ensayo WST-1. Para ello escogieron las concentraciones no citotóxicas de alcohol y tabaco; y para cada uno de los casos se hizo un duplicado en una placa de 16 pocillos (*E-Plate*, Roche Applied Science) (Figura 14). Se utilizó como control negativo la suspensión celular con medio de cultivo y DMSO. Para determinar la proliferación mediante el xCELLigence, se hizo primero una medición con 50µl de medio de cultivo DMEM/F'12 completo para obtener los valores del blanco o basales. A continuación se añadieron 100µl de la suspensión celular a una concentración de 9.000 células por pocillo que se dejaron adherir al fondo de la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se monitorizó la proliferación en el xCELLigence RTCA DP durante 24h con medio completo sin estímulos. Pasado ese tiempo se pausó el programa, se hizo un lavado con medio sin suero, y se añadieron 100µl de medio sin SFB con HEPES y antibióticos; se volvió a monitorizar el experimento durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadieron los estímulos directamente en cada pocillo y se monitorizó durante 24 y 48 horas.



**Figura 14.** Fotografía de la placa utilizada en el ensayo xCELLigence (*E-plate*) y microfotografía (10x) realizada del pocillo de la placa del xCELLigence.

Para el análisis de los resultados, se obtuvo el valor CI de cada caso tomado cada 15 minutos. El análisis de los datos se hizo utilizando el software *Real Time Cell Analyzer 1.2* (RTCA) (Figura 15). Para comparar los diferentes casos se tomó el

valor de las pendientes comparando el tiempo 0 (desde la adición de los diferentes estímulos) hasta las 24 horas; y desde el tiempo 0 hasta cumplir las 48 horas. De esta forma se compararon los valores de la pendiente de cada tratamiento con los valores de la pendiente del control negativo.



**Figura 15.** Fotografía del equipo xCELLigence y el *software Real Time Cell Analyzer 1.2 (RTCA)* utilizado para el análisis de datos.

## 9. Migración Celular

Respecto al estudio de la migración de las células estrelladas se utilizaron dos ensayos complementarios para confirmar los resultados obtenidos; el ensayo de cicatrización (*wound healing assay*) y el de migración mediante insertos (*transwell® migration assay*).

### 9.1. *Wound Healing Assay (WHA)*

El ensayo *Wound Healing* fue uno de los primeros en desarrollarse para el estudio de la migración celular *in vitro*(220). Se basa en la observación de la migración de

las células en una “herida” hecha sobre una monocapa de células. Este método imita en gran medida la migración de las células durante un proceso de reparación del tejido.

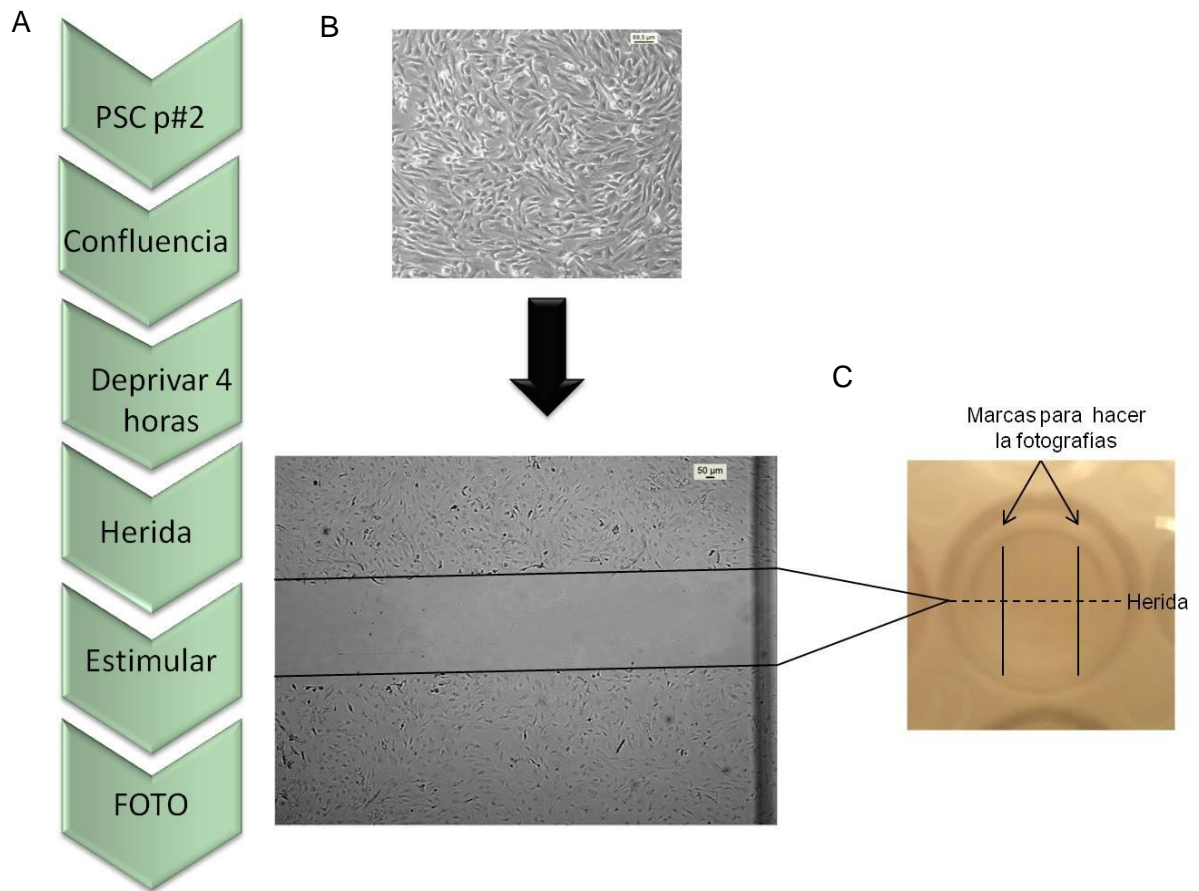
- Reactivos y materiales
- Estímulos:
  - Control negativo: Medio sin suero con DMSO.
  - Control de migración: Células en medio suplementadas con 15% SFB.
  - Control alcohol: 50mM de etanol.
  - Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.
- Placas de cultivo de 24 pocillos
- Puntas de pipeta de 10 $\mu$ L
- Microscopio LeicaDMil DFC 295
- Cámara c-Mount 0.55 $\alpha$

Se sembraron las células en el pase 2 en una placa de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta la confluencia. A aproximadamente un 90% de confluencia, las células se lavaron con PBS1x, y se añadió medio DMEM/F'12 sin suero con antibiótico y HEPES, para dejar incubando durante 4 horas. Pasado ese tiempo, se hizo una “herida” con la punta de pipeta de 10 $\mu$ L a lo largo del pocillo; a continuación se hizo un lavado con PBS1x con mucho cuidado para eliminar las células que se despegaron mecánicamente. A continuación se añadieron los diferentes estímulos disueltos en DMEM/F'12 sin suero. Se utilizó como control positivo de migración la suspensión celular en medio DMEM/F'12 suplementado con suero fetal bovino al 15% (221).

Tras realizar dos marcas en el fondo de la placa para comparar las fotografías en la misma localización, se realizaron fotografías a tiempo 0, 24 y 48 horas. Se hicieron dos fotografías de cada “herida” para cubrir toda el área con el objetivo 10X, y una foto a 4X para ver toda la “herida” en su conjunto (Figura 16).

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software de análisis *ImageJ* versión 1.43 (Wayne Rasband of the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se mostraron como porcentaje de

migración celular con respecto a las células suplementadas con SFB 15% y se compararon con el control negativo.



**Figura 16. Esquema y fotografías del ensayo WHA.**(A) Protocolo del ensayo WHA. (B) Microfotografías de las PSC en confluencia (10x) y una vez hecha la “herida” (4x). (C) Pocillo de una placa de 24 pocillos, mostrando las marcas para la realización del ensayo WHA.

## 9.2. *Transwell® Migration Assay*(TMA)

El presente método se utilizó para confirmar los resultados del ensayo de cicatrización ya que con éste método se elimina la posible interferencia de la proliferación celular.

- Reactivos y materiales
- Estímulos:
  - Control negativo: Medio sin suero con DMSO
  - Control alcohol: 50mM de etanol.
  - Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.
- Insertos *Transwell*® de 24 mm con membrana de policarbonato de 0,8µm (Corning Inc., EEUU)
- Placas de cultivo de 6 pocillos (Corning Inc., EEUU)
- PBS1x
- Metanol (Merck KGaA, Alemania)
- Solución de Tinción Giemsa (PAA, Austria)
- Bastoncillos de algodón
- Microscopio LeicaDMil DFC 295
- Cámara c-Mount 0.55α

#### Solución de tinción con Giemsa

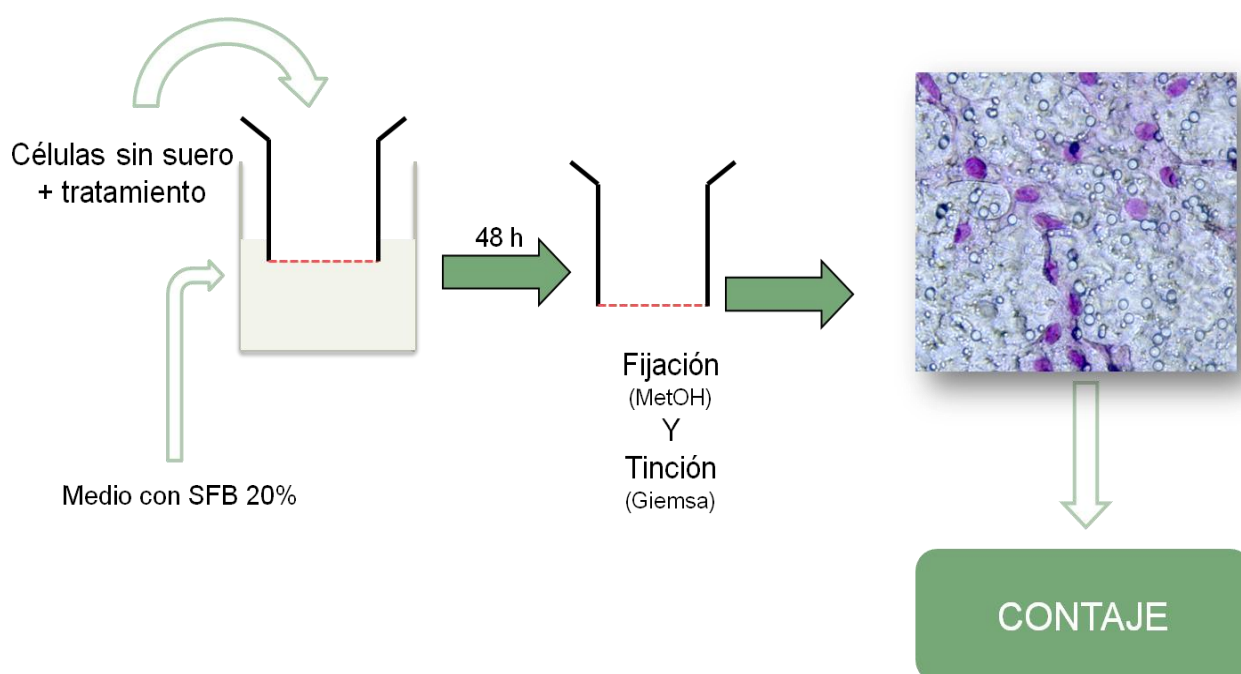
- Solución comercial de Giemsa (PAA, Austria) al 2% en H<sub>2</sub>O mQ.

Para este ensayo se utilizaron células de cultivo primario de PSC en pase 2; se sembraron en cada inserto 75.000 células en medio DMEM/F'12 sin suero fetal bovino con antibióticos y HEPES.

Una vez obtenidas las células del cultivo primario, se contaron y se recogieron 75.000 células en un tubo de 1,5mL en 600µL de medio de cultivo sin suero para ser estimuladas con los distintos tratamientos. Una vez tratadas, se añadieron 2 mL de medio DMEM/F'12 suplementado con 20% de suero fetal bovino con antibióticos y HEPES en la cámara baja del inserto para que actuase como quimioatrayente. A continuación se colocó el inserto sin hacer burbujas sobre esta cámara baja, y los 600µL de la suspensión celular con los diferentes estímulos se añadieron en cada uno de los insertos. Se dejó incubar durante 48 horas en el incubador celular.

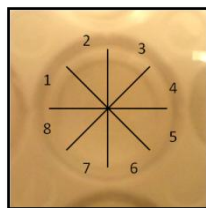
Transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el medio de las dos cámaras, y se lavó el inserto dos veces con PBS 1x. A continuación las células presentes en el

inserto se fijaron con metanol al 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el metanol, y se rehidrató la membrana introduciéndola en PBS1x durante unos minutos (hasta que se vea hidratada); finalmente se realizaron dos lavados con PBS. Para evitar falsos positivos se limpió la membrana de la cámara alta con un bastoncillo de algodón con precaución para no romperla. Se añadieron 2 mL de solución de tinción Giemsa en la cámara baja y 600  $\mu$ L en la superior, y se dejó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS1x para eliminar los restos de la solución de tinción, y se volvió a limpiar la cámara superior con una torunda de algodón (Figura 17).



**Figura 17. Esquema protocolo del ensayo de migración en *transwell*.**

Para contar las células que migraron, se dividió cada pocillo en 8 partes concéntricas (Figura 18). De cada una de esas partes se realizaron dos fotos en diferentes sitios al azar. Se contaron las células teñidas, y se calculó el promedio del número de células que migraron en cada caso.



**Figura 18. Pocillo de una placa para el análisis de migración del PSC**

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software *ImageJ* versión 1.43 (Wayne Rasband of the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se mostraron como media del número de células que migraron y se compararon con el resultado del control negativo.

## **10. Análisis de proteína**

### **10.1. Preparación de células para estudios de activación y síntesis de proteínas de matriz extracelular**

#### **10.1.1. Cultivo primario**

El cultivo de células estrelladas pancreáticas (en el pase 1 o en pase 2- Figura 12) se tripsinizó con 2 mL de tripsina-EDTA (0,01%), y se sembró por duplicado en placas de 6 pocillos a una concentración de 50.000 células por pocillo en medio completo durante 24 horas (Figura 19). A continuación, se lavaron con medio sin suero, y se añadió al final 2 mL de medio sin suero completado con HEPES y antibióticos. Tras la estabilización durante 4 horas, se añadieron los diferentes estímulos que se incubaron durante 24 horas. Se utilizó una suspensión celular tratada con la concentración de DMSO correspondiente a la utilizada en las células tratadas con tabaco como control negativo.

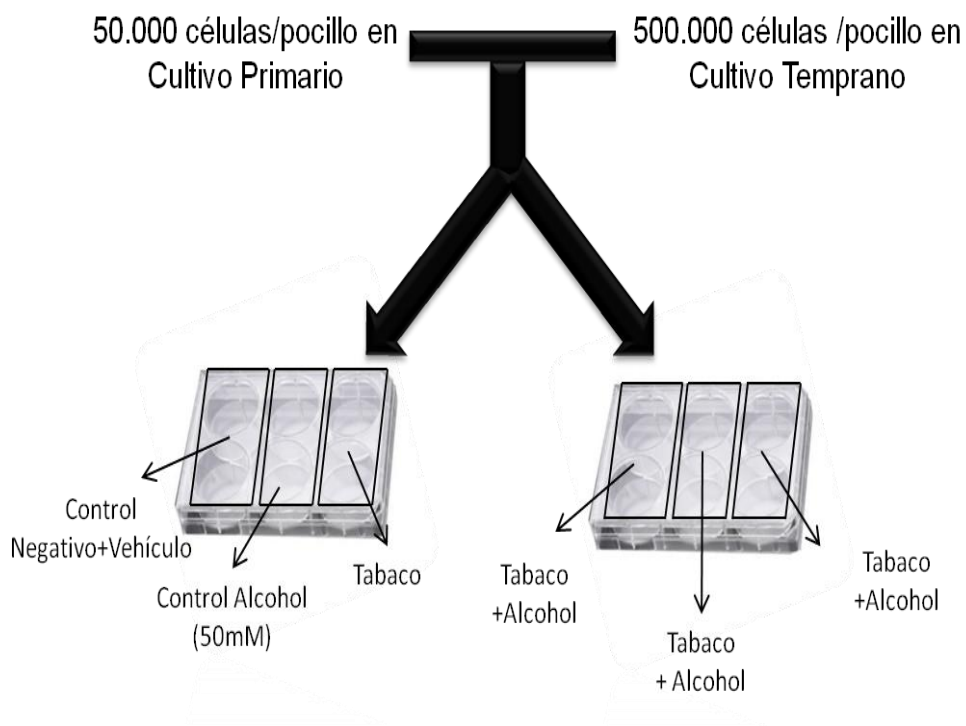
#### **10.1.2. Cultivo temprano**

A diferencia del cultivo primario, en el cultivo temprano las células se sembraron directamente en una placa de 6 pocillos (Figura 13). En cada placa se sembraron las células obtenidas de dos páncreas, aproximadamente 500.000 células/pocillo, y por duplicado para cada variable a estudio (Figura 19). Una vez sembradas las

células, tras 4 horas en placa con medio suplementado con 10% de SFB, las células fueron estimuladas con los distintos tratamientos durante 24 horas. Al igual que en el cultivo primario se añadió DMSO (vehículo del tabaco) al medio del control negativo. Los estímulos se dejaron durante el tiempo de incubación en el incubador de cultivos celulares. Pasado este tiempo se llevó a cabo la extracción de proteínas.

– Estímulos:

- Control negativo: Medio sin suero con DMSO
- Control alcohol: 50mM de etanol.
- Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.



**Figura 19. Esquema preparación de las muestras para estudios de expresión de  $\alpha$ -SMA.**

## 10.2. Extracción de proteínas de cultivo de células estrelladas pancreáticas

- Reactivos y materiales
- Tripsina-EDTA 0,01%
- Placas de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU)
- PBS1x
- Centrífuga Eppendorf 5415R (Eppendorf, Alemania)
- Raspador-*scraper* (Corning Incorporated (COSTAR),
- Jeringa de Insulina 1 mL (Becton Dickinson & Company, España)
- Aguja de Insulina 25 G (Becton Dickinson & Company, Irlanda)

### Solución RIPA

- Tris (Trizma®) pH 7,4 200mM (Sigma-Aldrich, EEUU)
- Na Cl 130mM (Panreac, España)
- Glicerol 10% (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania)
- SDS 0,1% (Sigma-Aldrich, EEUU)
- Tritón-X100 1% (Sigma-Aldrich, EEUU)
- MgCl<sub>2</sub> 10mM (Fluka Chemie GmbH, Suiza)
- Coctel de Antiproteasas comercial (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cóctel de Antifosfatasas comercial (Sigma-Aldrich, Alemania)

### 10.2.1. Secretomas

Los secretomas de los diferentes casos fueron recogidos tras pasar el tiempo de incubación. Se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 9.000g durante 3 minutos a 4°C, se guardó el sobrenadante a -80°C, para el análisis posterior de las proteínas secretadas.

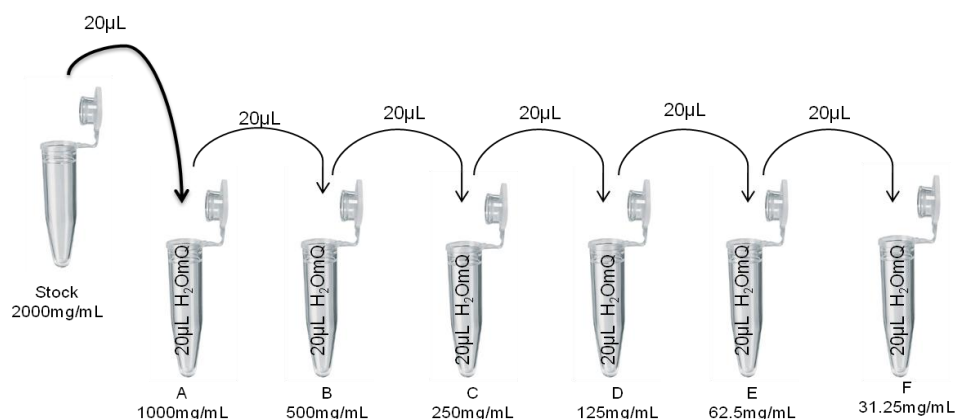
### 10.2.2. Proteína intracelular

Se aspiró el medio de cultivo y se centrifugó a 9.000 g durante 3 minutos a 4°C para recoger las células que no estaban adheridas al plato de cultivo; el pellet de células resultantes, se lavó con PBS1x, se volvió a centrifugar, y se eliminó el sobrenadante. A continuación las células se recogieron con 100µl de RIPA frío con antiproteasas y antifosfatasas (10µl/mL) y se echaron en el pocillo correspondiente de origen que había sido lavado previamente dos veces con PBS 1x frío. De esta forma, se lisaron tanto las células adheridas como las que estaban en suspensión. Se dejaron 30 minutos en hielo agitando manualmente cada 5 minutos. Con un raspador se rascó toda la superficie para asegurar el despegado del mayor número de células posible. En un tubo de 1,5mL el lisado celular se pasó 8 veces por una jeringa de insulina (1mL) para romper las células que aun mantenían la membrana íntegra. Finalmente la muestra se centrifugó a máxima velocidad (14.000rpm) durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se cuantificó y se guardó a -80°C para su posterior análisis.

### 10.3. Cuantificación de la muestra

- Reactivos y materiales
  - Suero de albumina bovino (BSA) fracción V (AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania)
  - Agua MiliQ (Merck Millipore, EEUU)
  - Solución Coomassie PLUS (Sigma-Aldrich, EEUU)
  - Espectrofotómetro DU®730 (Beckman Coulter Inc., EEUU)

Para cuantificar la cantidad de proteína se utilizó el método de Bradford(222). Para ello se hizo una curva de calibrado (1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25µg/mL) en un volumen final de 20µL partiendo de un stock de suero de albumina bovina (BSA) a una concentración de 2mg/mL diluido en agua miliQ. El blanco se hizo con 19µl de agua miliQ y 1 µL de RIPA (Figura 20).



**Figura20. Esquema preparación de la curva de calibrado con BSA.**

Las muestras se prepararon según instrucciones del fabricante. Se separaron de 30 a 40µg de proteína por muestra para su posterior análisis.

#### 10.4. Inmunodetección mediante *Western Blot*

Se analizaron las proteínas para el estudio de activación ( $\alpha$ -SMA) y para el estudio de síntesis de proteínas de matriz extracelular (fibronectina-1 y colágeno I) mediante inmunodetección *western blot*. Para ello se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa donde se incubaron con los anticuerpos específicos en cada caso.

##### 10.4.1. Preparación de las muestras para el análisis de proteína

- Reactivos y materiales

##### Tampón de carga 5x

- 400 mM Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 10% Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 50% Glicerol (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania)
- 5%  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 0,5% Azul de bromofenol (Panreac, España)

- Marcador de peso molecular *Spectra Multicolor* (Thermo Scientific, EEUU)

Las proteínas extraídas de los extractos celulares tanto del cultivo primario (30µg) como temprano (40µg) fueron disueltas en el tampón de carga 5x hasta un volumen final de 25 µL. Las muestras se hirvieron para desnaturalizar la proteína en un bloque de calor seco (*thermoblock*) durante 5 minutos a 100°C. En el caso de no usarse inmediatamente, se guardaron a -20°C hasta su uso. Una vez descongeladas se volvieron a hervir durante 5 minutos a 100°C antes de la electroforesis.

#### 10.4.2. Electroforesis

- Reactivos y materiales

##### Tampón de electroforesis

- 192 mM Glicina (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania)
- 25 mM Trizma® base (Sigma-Aldrich, Alemania )
- 0,1% Dodecil Sulfato Sódico (SDS) (Sigma-Aldric, Alemania)

##### Gel de resolución

- 8%-10% Acrilamida (AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania)
- 1.5 M Trizma® base, pH 8.8 (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 10% Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- 10% Amonio persulfato (APS) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- 0.4% Tetrameil-etil-enediamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, Alemania)

##### Gel de carga

- 5% Acrilamida (AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania)
- 1 M Tris-HCl, pH 6.8 (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 10% Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 10% Amonio persulfato (APS) (Sigma-Aldrich,Alemania)
- 0.1% Tetrameil-etil-enediamina (TEMED) (Sigma-Aldrich,Alemania)

Las muestras de proteína se separaron en un gel SDS-PAGE del 8%-10% en función del peso molecular de la proteína a analizar. En la primera calle del gel se cargó el marcador de peso molecular diluido en tampón de carga 1x para poder determinar el peso de las proteínas estudiadas.

- a) En el caso del estudio de activación, se determinó la proteína actina  $\alpha$  de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) con un peso molecular de 42kDa, en un gel con un porcentaje del 10% de acrilamida. En este caso la electroforesis se mantuvo a voltaje constante 80V en el gel de carga, subiendo el voltaje hasta 100V en el gel separador en tampón de electroforesis.
- b) En el caso del estudio de proteínas de matriz extracelular, ambas proteínas tenían un peso molecular elevado: 115 kDa en el caso del colágeno I, 220kDa en el caso de la fibronectina-1. Por este motivo el porcentaje de acrilamida utilizado fue del 8%. La electroforesis se mantuvo a voltaje constante 60V en el gel de carga, subiendo el voltaje hasta 90V en el gel separador en tampón de electroforesis.

#### 10.4.3. Transferencia

- Reactivos y materiales

##### Tampón de transferencia

- 192 mM Glicina (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania)
- 25 mM Trizma® base (Sigma-Aldrich, Alemania)
- 0,1% Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- 20% Metanol (Merck KGaA, Alemania)

- Membranas de nitrocelulosa 0,45 $\mu$ m (Bio-Rad, EEUU)

Una vez separadas las proteínas por peso molecular se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45µm. El método utilizado para la transferencia varió en función del peso molecular de las proteínas a analizar.

- Transferencia semi-seca:

Para las proteínas de bajo peso molecular, como es el caso de  $\alpha$ -SMA (42 kDa), GAPDH (37 kDa) o  $\beta$ - Actina (42 kDa) se utilizó el sistema de transferencia semi-seca (*Trans-Blot SD, Semidry transfer Cell-BioRad*, EEUU), durante 45 minutos a 200 mA, en tampón de transferencia frío.

- Transferencia Húmeda:

En el caso de las proteínas de mayor peso molecular, como es el caso del colágeno I (115kDa) y fibronectina -1 (IST-9) (220 kDa), se utilizó el sistema de transferencia húmedo. Se dejó la transferencia a 200mA constantes a 4°C durante 2 horas, con tampón de transferencia frío.

Tras la transferencia, en los casos que fue posible (estudio de proteínas de alto peso molecular), se cortó la membrana, utilizando como guía el marcador de peso molecular para la detección de  $\beta$ - Actina (42 kDa) utilizada como control de carga.

En los casos que no fue posible cortar la membrana ( $\alpha$ -SMA), se eliminó el anticuerpo unido con un tampón específico y se rehibridó con el anticuerpo anti-GAPDH (37kDa).

#### 10.4.4. Tinción con Rojo *Ponceau*

Para comprobar que la transferencia fue correcta, se utilizó la tinción con rojo *Ponceau*, que tiñe proteínas de forma inespecífica. Una vez terminada la transferencia, se introdujo la membrana en una solución de 0,1% de rojo *Ponceau S* (AppliChemGmbH-Darmstadt, Alemania). A continuación la membrana se lavó con solución de lavado (ver reactivos y materiales de inmunodetección) para eliminar los restos de la tinción.

#### 10.4.5. Inmunodetección

- Reactivos y materiales

##### Solución de Lavado

- 1 x Tampón Fosfato Salino (PBS)
- 0.1% Tween 20 (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania)

##### Solución de Bloqueo

- 1x PBS
- 0,1% (v/v) *Tween-20* (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania)
- 5% (p/v) Suero de Albumina Bovino (BSA, siglas en inglés) fracción V (AppliChemGmbH, Alemania) o 5% (p/v) de leche en polvo (Dietisia, Sbelium- España)

##### Solución de rehibridación-*Stripping*

- Tris 1M a pH 6,7 con 10% SDS y 7%  $\beta$  Mercaptoetanol en agua miliQ.

- Kit de detección quimioluminiscente HRP @ECL (Pierce Thermo Scientific, EEUU)

Tras la transferencia, se bloquearon las membranas con solución de bloqueo para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Según las especificaciones de cada anticuerpo se utilizó para ello leche o BSA a una concentración de 5% p/v en PBS-T. Se dejó en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente.

Una vez bloqueada la membrana, se preparó el anticuerpo primario contra la proteína a analizar en 5mL de solución de bloqueo, y se dejó incubar con la membrana toda la noche en agitación constante a 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con solución de lavado (PBS-T) en agitación constante para eliminar el anticuerpo que no se haya unido. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1 hora

en agitación y a temperatura ambiente. Se hicieron otros 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con solución de lavado en agitación para eliminar el anticuerpo secundario no unido.

#### Rehibridación de la membrana con control de carga (GAPDH)

Para rehibridar la membrana del estudio de la proteína  $\alpha$ -SMA, se incubó a 50°C durante 10 minutos en agitación en solución de rehibridación-*stripping*. A continuación se lavó 3 veces durante 10 minutos con solución de lavado. Se volvieron a bloquear las uniones inespecíficas y se siguió el protocolo tal y como se explicó anteriormente.

Las diluciones de los anticuerpos primarios, la solución de bloqueo empleada y el correspondiente anticuerpo secundario se muestran en la Tabla 3.

Anticuerpo Primario	Peso Molecular	Casa Comercial	Dilución	Anticuerpo Secundario	Bloqueo	Casa Comercial	Dilución
<b>GAPDH</b>	37 kDa	Abcam	1:1000	<b>Anti-ratón</b>	BSA 5%	Thermo Scientific	1:5000
<b><math>\alpha</math> SMA</b>	42 kDa	Sigma- Aldrich	1:1000	<b>Anti-ratón</b>	BSA 5%	Thermo Scientific	1:5000
<b><math>\beta</math> Actina</b>	42 kDa	Santa Cruz Biothecnology	1:2000	<b>Anti-ratón</b>	BSA 5%	Thermo Scientific	1:5000
<b>Fibronectina-1 (IST9)</b>	220 kDa	Santa Cruz Biothecnology	1:500	<b>Anti-ratón</b>	Leche 5%	Thermo Scientific	1:1500
<b>Colágeno I</b>	115 kDa	Calbiochem	1:500	<b>Anti-conejo</b>	BSA 5%	Thermo Scientific	1:1500

**Tabla 3. Anticuerpos primarios con su correspondiente secundario utilizados.**

Las bandas de la proteína a estudio se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, EEUU).

Para el revelado se utilizaron dos métodos distintos dependiendo de la proteína:

- Para las proteínas de bajo peso molecular, las bandas se visualizaron con el sistema de imagen automático *BioSpectrum Imaging System* para *western blot* (UVP, LLC, Canadá).

- Para las proteínas de alto peso molecular (Colágeno I y fibronectina-1) se utilizaron placas radiográficas (Agfa-Gevaert, Bélgica) que se revelaron utilizando la máquina reveladora XR24 Pro (DÜRR NDT, Alemania)

#### 10.4.6. Cuantificación

El análisis de densitometría de las bandas se hizo con el *software Image J* versión 1.43 (Wayne Rasband of the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de densitometría frente al control negativo.

### 10.5. Inmunocitoquímica

#### 10.5.1. Preparación de muestras

Tras el pase 2, las células estrelladas fueron tripsinizadas (Tripsina-EDTA al 0,01%) y se sembraron en una placa de 24 pocillos a una concentración de 20.000 células por pocillo por duplicado para cada condición a estudio de forma que uno de ellos sirvió como control negativo para el ensayo (Figura 21). Tras estar 24 horas en medio de cultivo completo, se hizo un lavado con medio DMEM/F'12 sin suero y se añadieron los diferentes estímulos. Las células tratadas con 50mM de etanol se utilizaron como control positivo. Al control negativo se añadió DMSO como vehículo del tabaco como en los casos anteriores. Las células se dejaron en el incubador durante 24 y 48 horas.

- Reactivos y materiales

- Estímulos:

- Control negativo: Medio sin suero con DMSO
- Control alcohol: 50mM de etanol.
- Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.

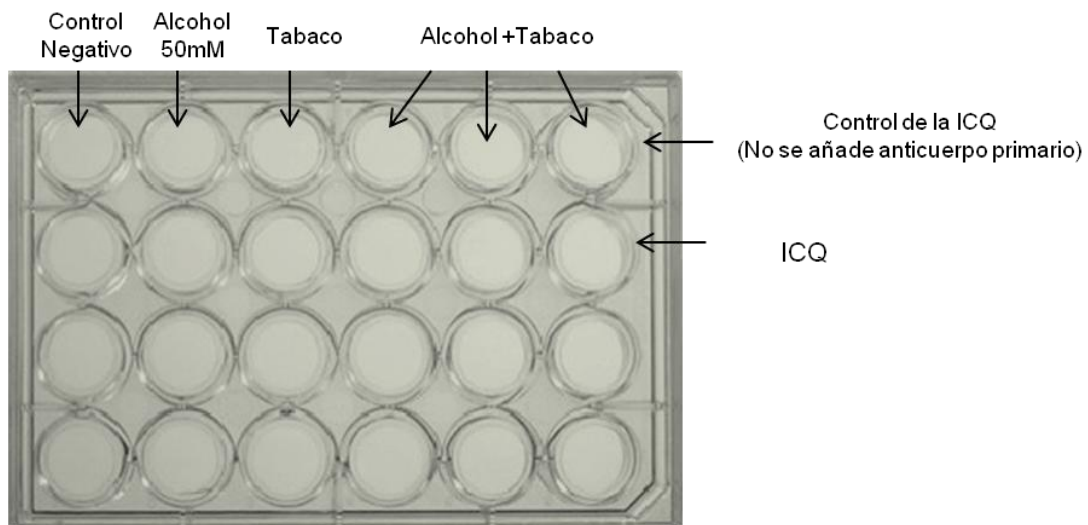


Figura 21. Esquema de preparación de las muestras para el ensayo de ICQ.

- Tampón Fosfato Salino estéril (PBS) a pH 7,4
- Metanol-Acetona 1:1
- *Triton X-100* (0.2%) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Inhibidor de Peroxidasa endógena (DAKO, Dinamarca)
- *Envision Flex/ HRP* (DAKO, Dinamarca)
- Tampón sustrato de DiaminoBencidina (DAB) (DAKO, Dinamarca)
- Cromógeno DAB (DAKO, Dinamarca)
- Hematoxilina de Harris
- Tampón Tris salino y *Tween 20* (TBS'T) a pH 7,4 que contiene Tris (50mM), NaCl (150mM), *Tween 20* (0,05%).
- Alcohol 96° (Merck KGaA, Alemania)
- Microscopio LeicaDMil DFC 295
- Cámara c-Mount 0.55α

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con los diferentes estímulos, se aspiró el medio de cultivo, se realizaron tres lavados con PBS1x para eliminar el medio de cultivo, y se fijaron las células durante 10 minutos con metanol-acetona 1:1. Se hicieron tres lavados con PBS 1x y se llevó a cabo la permeabilización de las membranas celulares con 0,2% de triton X-100 durante 10 minutos.

Se lavó de nuevo tres veces con PBS1x y, a continuación, se inhibió la peroxidasa endógena con un preparado comercial (DAKO, Dinamarca) durante 10 minutos. Se lavó de nuevo y se incubó durante 45 minutos con el anticuerpo primario diluido 1:50 (fibronectina-1) a temperatura ambiente en agitación constante. Se lavó el anticuerpo con PBS 1x y se añadió en anticuerpo secundario comercial que tiene un sistema de doble enlace que detecta anticuerpo primario de ratón y conejo, (Envision FLEX/HRP, DAKO, Dinamarca) durante 30 minutos a temperatura ambiente también en agitación. Se añadió finalmente el cromógeno DAB disuelto en el sustrato correspondiente, y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de lavar con agua destilada.

A continuación se tiñó con hematoxilina de Harris durante 2 minutos. Posteriormente se lavó con agua destilada y a continuación se añadió TBS-T para azular los núcleos. Por último se lavó con agua del grifo a 37°C.

Se fijaron las tinciones con dos lavados con alcohol 96° y posteriormente otros dos lavados con alcohol absoluto y se dejó secar.

Para cuantificar las células positivas se dividió cada pocillo en 8 partes iguales y se realizaron dos fotos en dos zonas al azar de cada una de las 8 áreas. Se hizo un conteo de las células teñidas, y se calculó el promedio del número de células positivas en cada caso.

Para el análisis de las imágenes se utilizó el *software ImageJ* versión 1.43 (Wayne Rasband of the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se mostraron como número de células positivas y se compararon con el control negativo.

## 10.6. Tinción con Tricrómicro de Masson

Esta técnica permite visualizar las fibras de colágeno tipo I de una muestra. Aunque sea una tinción específica de tejido, el objetivo de este ensayo es comprobar la expresión y localización del colágeno I en las células estrelladas pancreáticas.

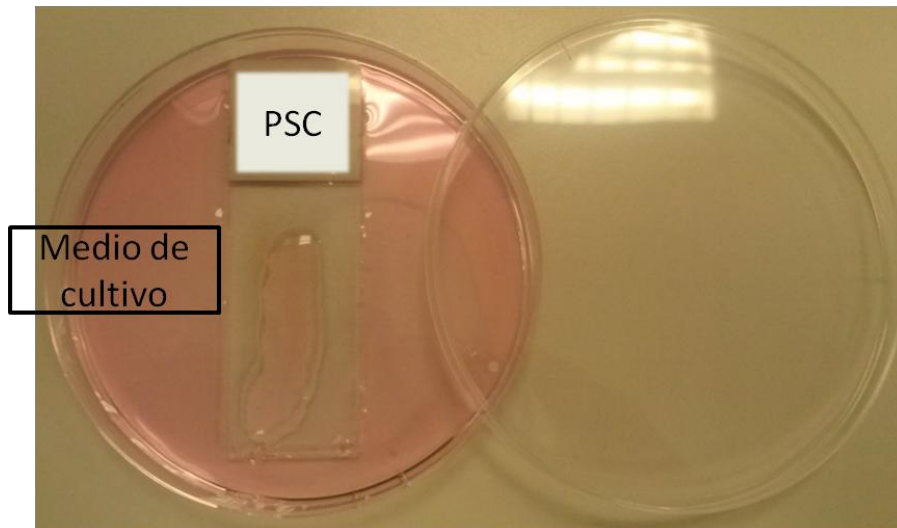
- Reactivos y materiales
  - Estímulos:
    - Control negativo: Medio sin suero con DMSO.
    - Control alcohol: 50mM de etanol.
    - Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.
  - Placa petri 100mm
  - Portaobjetos para inmunocitoquímica (DAKO, Dinamarca)
  - Solución de lavado (DAKO, Dinamarca)
  - Solución de Bouin (DAKO, Dinamarca)

#### Tinción:

- Hematoxilina de Weigert A y B (DAKO, Dinamarca)
- Solución acida *Biebrich Scarlet* (DAKO, Dinamarca)
- Ácido Fosfomolibdico (DAKO, Dinamarca)
- Solución Azul de Anilina (DAKO, Dinamarca)
  - Ácido Acético (DAKO, Dinamarca)
  - Sistema de tinción Artisan-Dako (DAKO, Dinamarca)
  - Microscopio LeicaDMil DFC 295
  - Cámara c-Mount 0.55α

Se tripsinizaron las PSC en pase 2 y se sembraron 30.000 células en cada portaobjetos, introduciendo cada uno en una placa petri. Se mantuvieron las células durante 12 horas para asegurar su adherencia al portaobjetos con 3 mL de medio completo, evitando que cubra el portaobjetos, en la placa con el fin de proporcionar humedad al medio (Figura 22). Transcurrido ese tiempo, se hizo un lavado para eliminar las células que no se pegaron con medio sin suero complementado con antibióticos y HEPES. Se cubrió con 5 mL de medio sin suero complementado con

antibióticos y 15mM de HEPES y se dejó durante 4 horas en el incubador. Transcurrido ese tiempo, se añadieron los estímulos correspondientes, y se dejó incubar durante 24 y 48 horas.



**Figura 22. Tinción Tricrómica de Masson.** Fotografía representativa de la preparación de muestra para el ensayo de tinción con Tricrómico de Masson

La tinción se realizó mediante un sistema de tinción automatizado Artisan-Dako (DAKO) en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago. Para ello, las células se lavaron con una solución de lavado comercial proporcionado por el fabricante y a continuación se fijaron con la solución de Bouin (DAKO) para llevar a cabo la tinción [Hematoxilina de Weigert A y B, solución ácida *Biebrich Scarlet*, ácido fosfomolibdico y solución azul de anilina (DAKO)]. Finalmente se fijó con ácido acético y se hizo el montaje con xilol.

Se determinó la presencia o ausencia de fibras de colágeno I (color azul) y se tomaron fotografías bajo microscopio.

#### 10.7. Inmunoensayo enzimático (ELISA) para fractalquina

- Reactivos y Materiales
  - Kit ELISA anti *fractalkine*(CX3CL1) para rata (Abvona, Taiwan)
  - Lector de Placas VERSAmax (Bionova Científica, España)

Se determinaron las concentraciones de la citoquina fractalquina (CX3CL1) mediante la técnica de ELISA en el sobrenadante celular, utilizando un kit comercial para fractalquina de rata (Abnova, Taiwan). En este ensayo, la primera reacción se produce por la unión de la citoquina presente en los sobrenadantes celulares con el anticuerpo monoclonal que está unido a la placa. Tras esta reacción tiene lugar la unión del anticuerpo secundario, que lleva unida una molécula de biotina, al complejo (Citoquina-Anticuerpo 1<sup>o</sup>). A continuación, se añade la molécula avidina (con gran afinidad por la biotina) unida a la enzima peroxidasa. Al añadir el sustrato para esta enzima tiene lugar una reacción cuyo producto proporciona un color azul a la muestra. Finalmente se para la reacción con un reactivo que produce un cambio de color de azul a amarillo. La intensidad de este color se mide mediante espectrofotómetro VERSAmax a una longitud de onda de 450nm. La densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de la citoquina.

La recta de referencia se realizó con los patrones de concentración conocida proporcionado por el fabricante, y se utilizaron para extrapolar los resultados obtenidos en el ensayo.

Los tiempos de incubación con cada reactivo se ajustaron a los indicados por el fabricante.

## **11. Análisis de Producción de Especies Reactivas del Oxígeno**

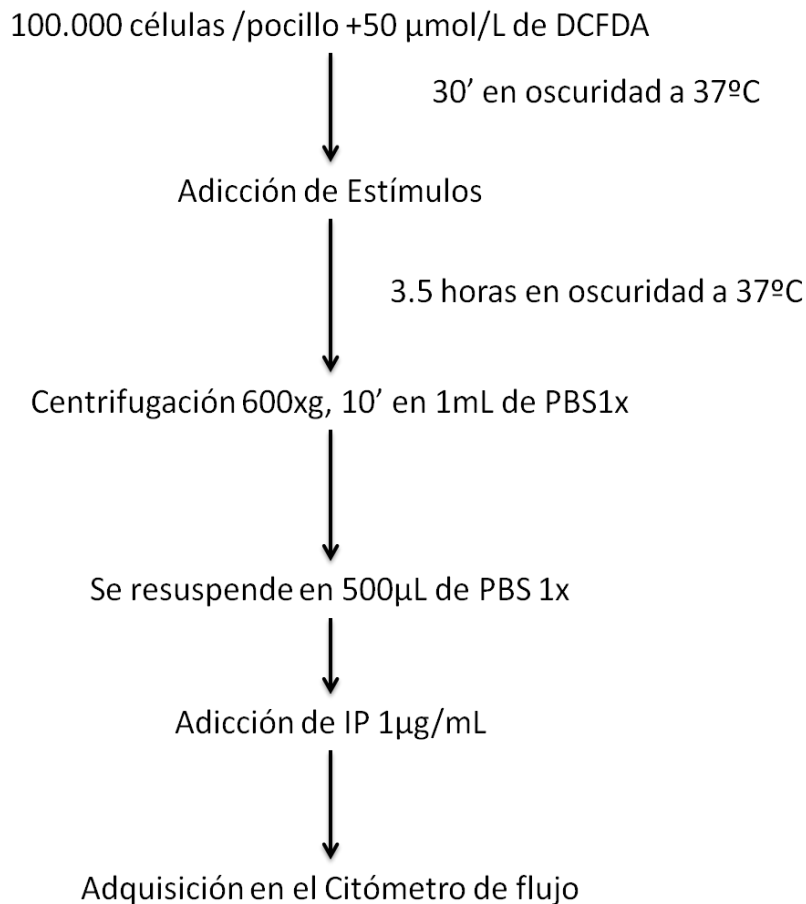
La determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en cultivo primario de células estrelladas pancreáticas se llevó a cabo mediante el reactivo 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) que es un colorante fluorescente permeable a través de las membranas celulares y mide actividad hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas del oxígeno dentro de la célula. Una vez que traspasa las membranas celulares el DCFDA es desacetilado por esterasas celulares, a un compuesto no fluorescente que no es permeable a través de las membranas, y posteriormente se oxida por actividad de ROS a 2'-7' diclorofluoresceína (DCF) que

es altamente fluorescente. Esta fluorescencia se va a detectar mediante citometría de flujo.

- Reactivos y Materiales
  - Estímulos:
    - Control negativo: Medio sin suero con DMSO
    - Control alcohol: 50mM de etanol.
    - Dosis no citotóxicas de tabaco sólo o combinadas con alcohol.
  - Placas de 6 pocillos
  - Tampón Fosfato Salino estéril (PBS) a pH 7,4
  - Sonda 2'-7' Diclorofluoresceína diacetato (Sigma-Aldrich, Alemania)
  - Sonda ioduro de propidio 1mg/mL (Invitrogene, EEUU)
  - Citómetro de flujo (Becton Dickinson Biosciences, EEUU)

Para determinar la actividad de ROS intracelular nos basamos en el protocolo descrito anteriormente(122). Las células estrelladas ( $1 \times 10^5$  células/pocillo, en placas de 6 pocillos) se sembraron y se dejaron en medio de cultivo completodurante 12 horas. A continuación, se hizo un lavado y se dejaron durante 4 horas en medio de cultivo sin suero completado con antibióticos y HEPES; transcurrido este tiempo, se marcaron con la sonda DCF-DA  $50 \mu\text{M}$  disuelta en medio, durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  preservado de la luz. Se hizo un lavado con medio DMEM sin suero fetal bovino, para eliminar el exceso de sonda que no traspasó la membrana para evitar falsos positivos, y se añadieron los estímulos correspondientes disueltos en medio DMEM sin suero fetal bovino. Los estímulos se dejaron actuar durante 3,5 horas en el incubador. Transcurrido el tiempo de incubación con los diferentes estímulos las células fueron tripsinizadas y se resuspendieron en PBS 1x a  $4^\circ\text{C}$ . Se añadió el ioduro de propidio  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  en cada muestra para determinar la viabilidad celular. Finalmente se analizó la presencia de especies reactivas del oxígeno como la intensidad de fluorescencia del 2'-7'-diclorofluoresceína formada por la oxidación de DCFDA mediante citometría de flujocon la siguiente configuración: *forward light scatter* (FSC) E-1;*side lighth*

scatter(SSC):227;FL-1 log: 600; FL-2log: 539;de más de 6.000 células viables de cada muestra (Figura 23).



**Figura 23. Esquema análisis de producción de ROS en PSC**

La adquisición y análisis de los resultados se realizó utilizando el programa informático Cell QuestPro (Becton Dickinson Biosciences, EEUU).

## **12. Análisis Estadístico**

Todos los resultados se muestran como media  $\pm$  error típico de la media de n=5 de cada análisis. Para comparar los diferentes métodos de aislamiento se aplicó el test t-student. Con el fin de establecer las diferencias entre los diferentes tratamientos en comparación con los controles se aplicó el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos en cada sub-estudio para contrastar la

igualdad de medias. Posteriormente se aplicó el test de Fisher (LSD; *Least Significant Difference test*) para establecer las diferencias existentes entre los controles y los diferentes tratamientos. En todos los casos se consideraron diferencias significativas para valores de  $p < 0,05$ .

### **13. Consideraciones Éticas**

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Bioético de la Universidad de Santiago de Compostela, cumpliendo la normativa de Manipulación de Animales Experimentales y de Laboratorio con la Ley Internacional de Experimentación Animal.



## *5. Resultados*



# Resultados

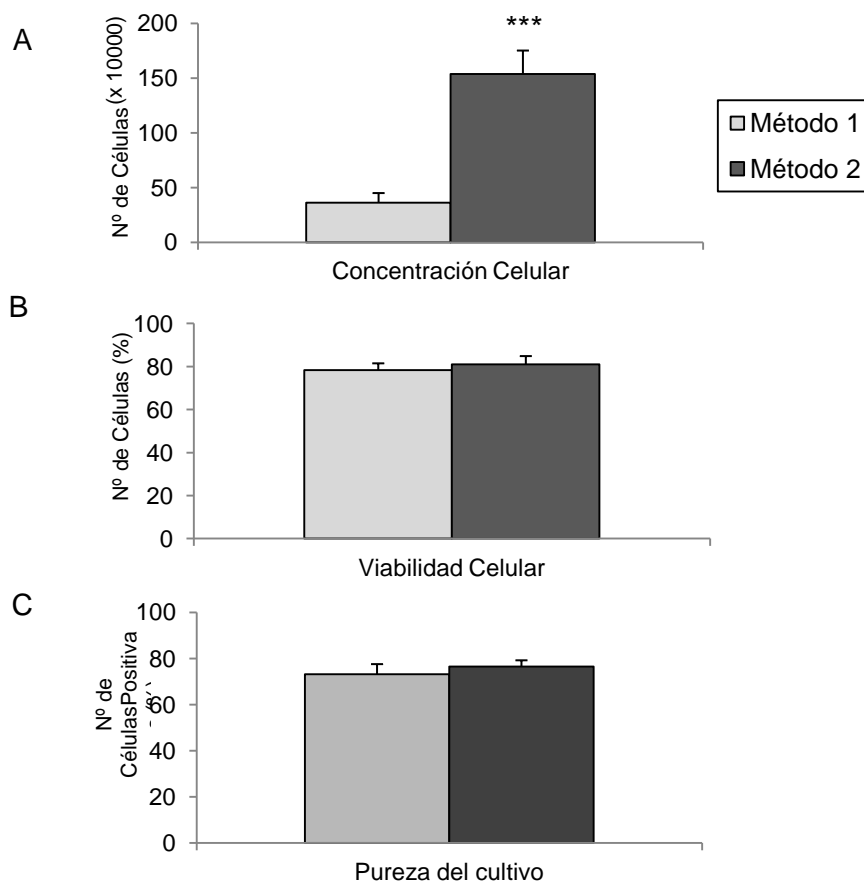
---

## 1. Aislamiento de células estrelladas proveniente de páncreas de rata y caracterización de las células en cultivo.

Como ya se ha explicado en el apartado anterior, el método de aislamiento celular se basa en las características morfológicas de las PSC, que al poseer gránulos lipídicos en su interior, tienen menor densidad que otros tipos celulares pancreáticos. Con el fin de optimizar y caracterizar el cultivo se compararon dos métodos de aislamiento donde se incrementó el tiempo de digestión de 12 minutos, en el método 1, a 25 minutos, en el método 2, sin modificar las demás condiciones de aislamiento.

Tras la realización de 5 aislamientos celulares con cada método, se analizó la concentración celular, la viabilidad celular y la pureza del cultivo en cada aislamiento por separado. Se determinó que con un incremento de 13 minutos en el tiempo de digestión, se obtuvo una concentración celular significativamente mayor,  $1,5 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^5$  células/mL en el método 2 vs  $3,6 \times 10^5 \pm 0,87 \times 10^5$  células/mL en el método 1 ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre ambos métodos de aislamiento en el porcentaje de viabilidad celular ( $81 \pm 3,8$  en el método 2 vs  $78,31 \pm 3,2$  en el método 1,  $p = 0,55$ ) ni en el porcentaje de pureza del cultivo ( $76,55 \pm 2,6$  en el método 2 vs  $73,15 \pm 4,4$  en el método 1,  $p = 0,47$ ) (Figura 24).

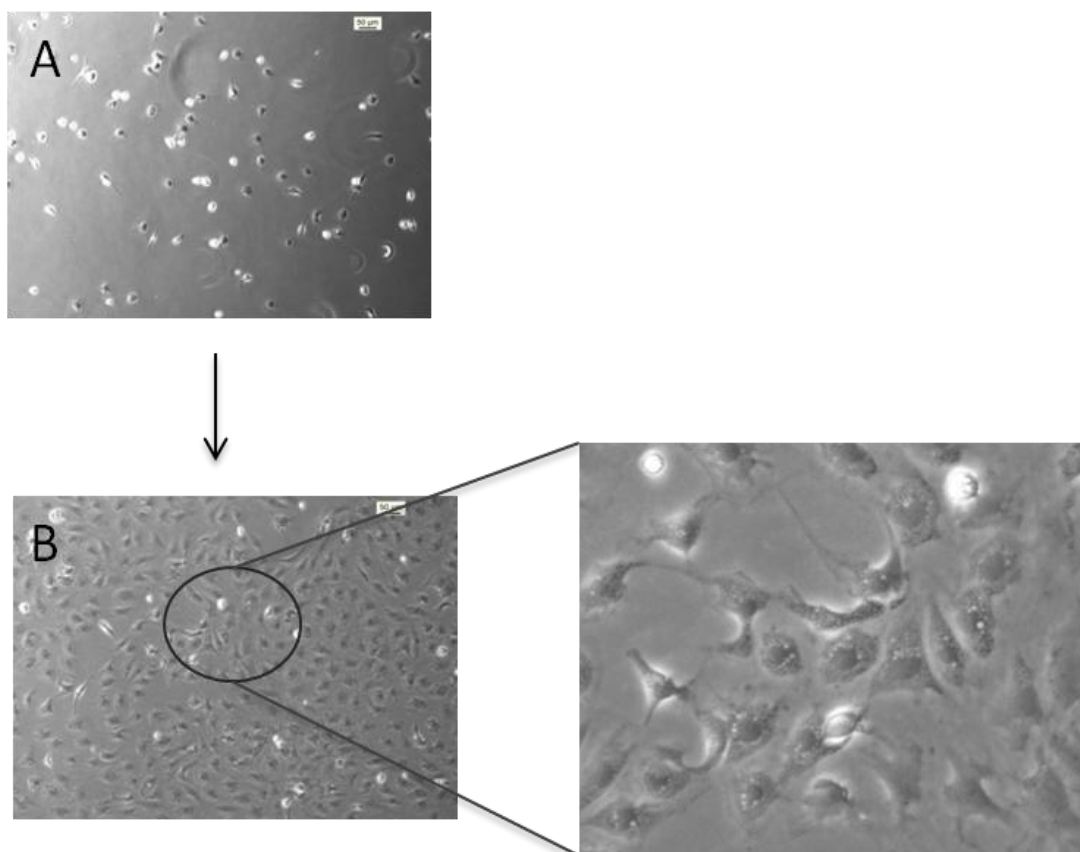
Las células estrelladas son dependientes de anclaje, y tras 24 horas en cultivo se adhieren a la placa. Como el método 2 aportó un mayor número de células, se consiguió alcanzar antes la confluencia que en el método 1. Además con este método, tras 5 días en cultivo, se mantenían los gránulos de vitamina A haciendo idóneo este tiempo de incubación para la realización de experimentos que requieren a las PSCs con características de etapa quiescente. (Figura 25 y 26).



**Figura 24. Concentración celular (A), viabilidad celular (B), y pureza del cultivo (C).** Los valores representan medias  $\pm$  error típico. N=5 en cada método utilizado. Método 1 descrito por Rickmann y col. y el método 2 aumentando el tiempo de digestión a 25 minutos. Se aplicó el test T-student para determinar las diferencias entre ambos métodos de aislamiento (\*\*\*)  $p < 0,001$ .



**Figura 25. Microfotografía de una célula estrellada pancreática tras 5 días en cultivo.** Se observan los gránulos de vitamina A intracitoplasmáticos. Microscopio óptico (20x).



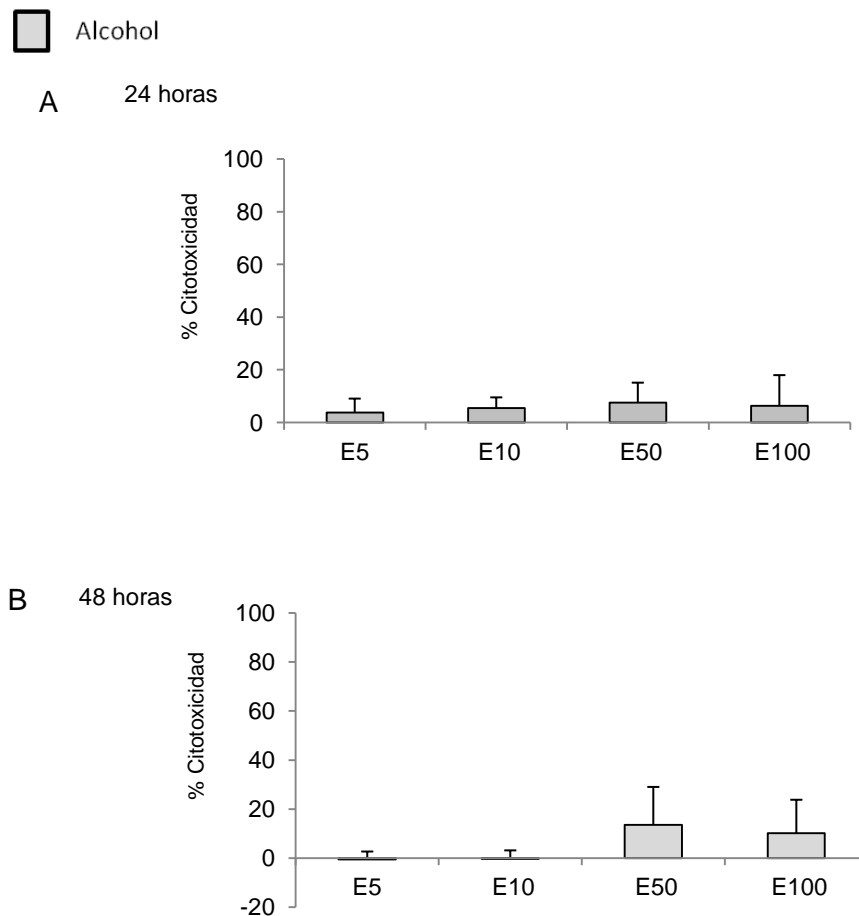
**Figura 26. PSC tras 24 horas (A), y 96 horas (B) en cultivo primario.** Microfotografías de células estrelladas pancreáticas donde se muestra la evolución de las células en cultivo primario (10x). Se observa que tras 5 días en cultivo las células mantienen los gránulos de vitamina A en su interior.

## **2. Efecto del tabaco sobre la citotoxicidad y la proliferación de células estrelladas pancreáticas**

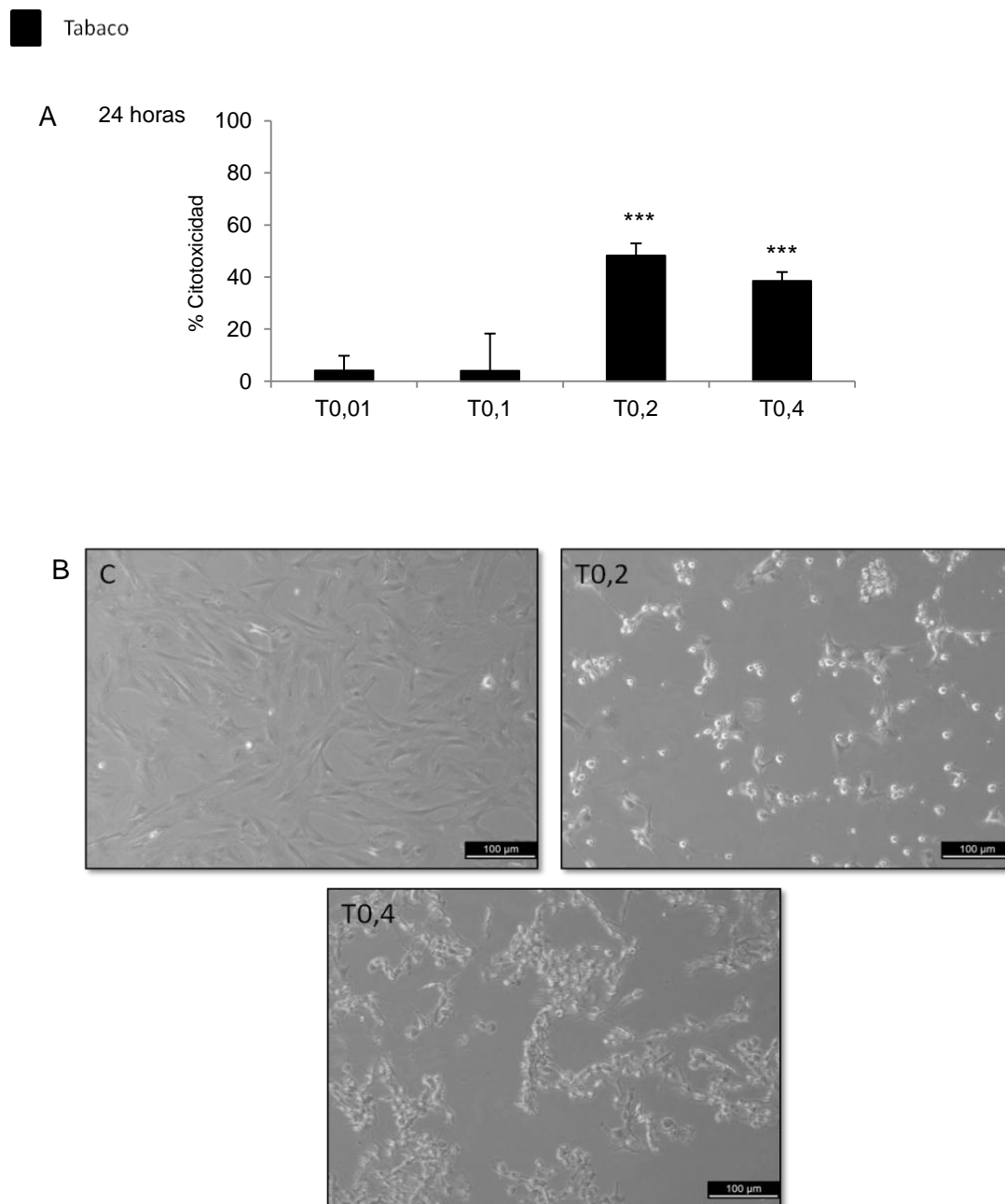
### **2.1. Análisis de citotoxicidad celular**

Tal como se ha explicado en el apartado anterior, para el presente estudio se ensayaron concentraciones de alcohol (5-100mM) y tabaco (0,01-0,4mg/mL) que se consideran clínicamente relevantes(180). Con el fin de testar la toxicidad de dichas concentraciones de alcohol y tabaco, se realizó un estudio previo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) por parte de las PSC tras el tratamiento con ambos

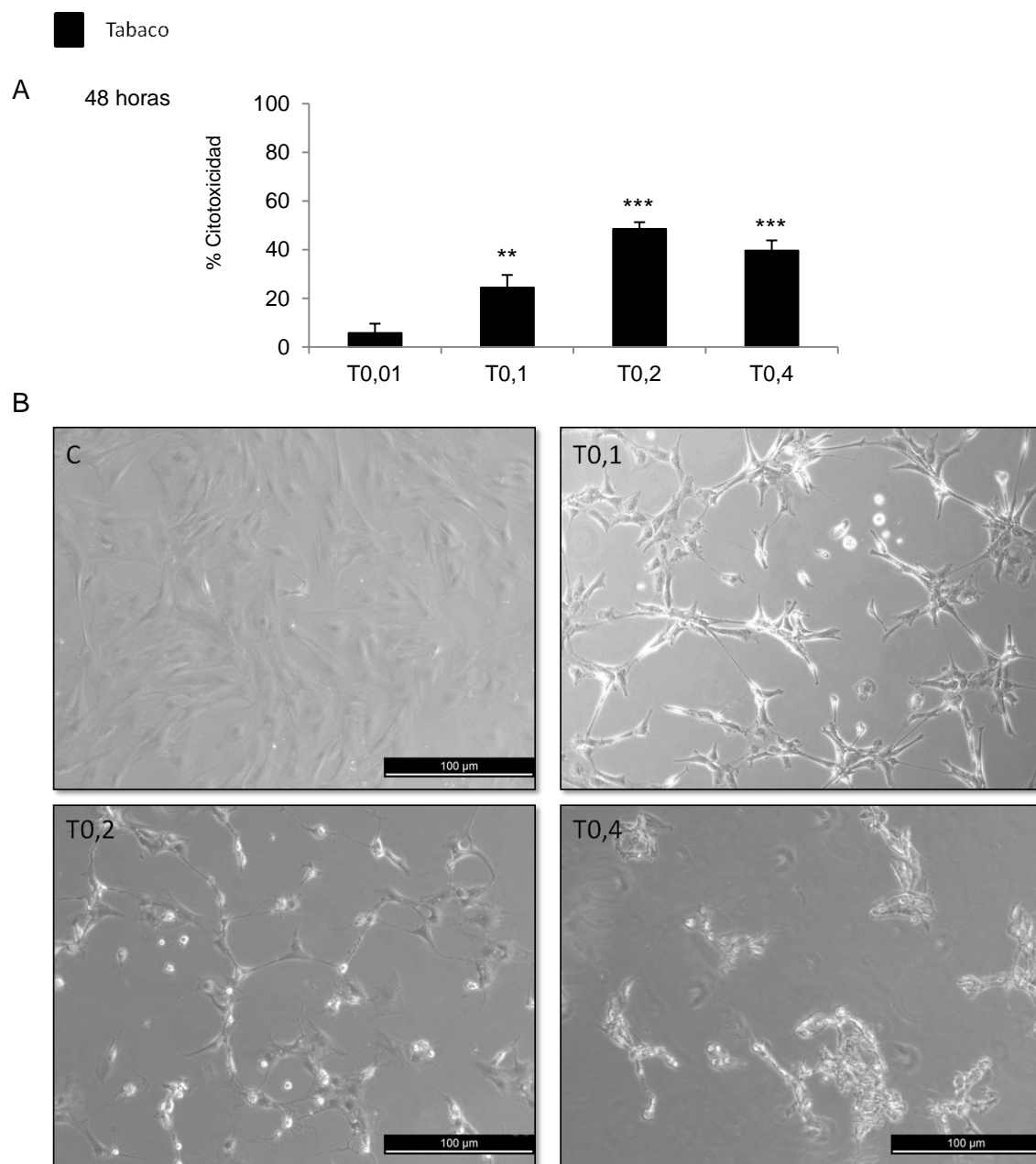
tóxicos de forma independiente durante 24 y 48 horas. En el presente estudio se vio que ninguna de las concentraciones de etanol estudiadas produjo un efecto tóxico sobre las PSC tanto a las 24 como a las 48 horas (Figura 27 A y B; Tabla 4). Sin embargo, concentraciones de 0,1mg/mL o superiores de tabaco tiene un efecto tóxico sobre las PSCs tras 48 horas de incubación (Figura 29 A y B; Tabla 4). Este efecto tóxico también se observó para las concentraciones 0,2 y 0,4mg/mL a las 24 horas (Figura 28 A y B; Tabla 4). La toxicidad producida por dichas concentraciones de tabaco no se ve modificada por la adición de etanol(Figura 30 y 31; Tabla 4).



**Figura 27. Citotoxicidad (%) de las PSC en respuesta a alcohol a las 24 horas (A) y 48 horas (B) de incubación.** Los valores representan porcentaje vs control células lisadas  $\pm$ error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento).

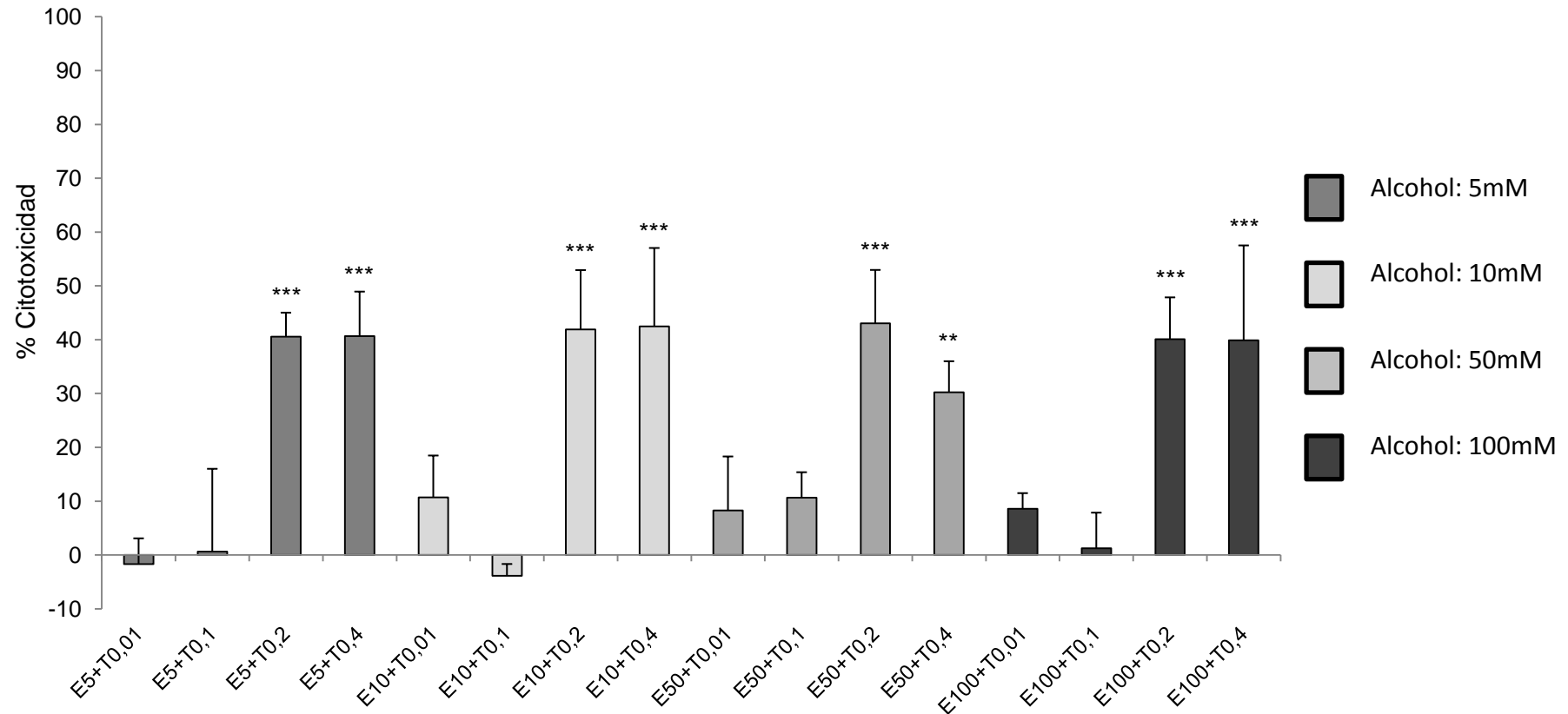


**Figura 28. Citotoxicidad (%) de las PSC en respuesta a tabaco (A) y microfotografías de PSC (B) tras 24 horas de incubación.** (A) El tabaco a concentraciones de 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,2 y T0,4 respectivamente) tienen un efecto tóxico sobre las PSC. Los valores representan porcentaje vs control células lisadas  $\pm$  error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento) (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (B) Microfotografías (10x) de PSC tras el tratamiento con tabaco 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,2 y T0,4 respectivamente) en comparación con el control negativo (C) tras 24 horas en cultivo.



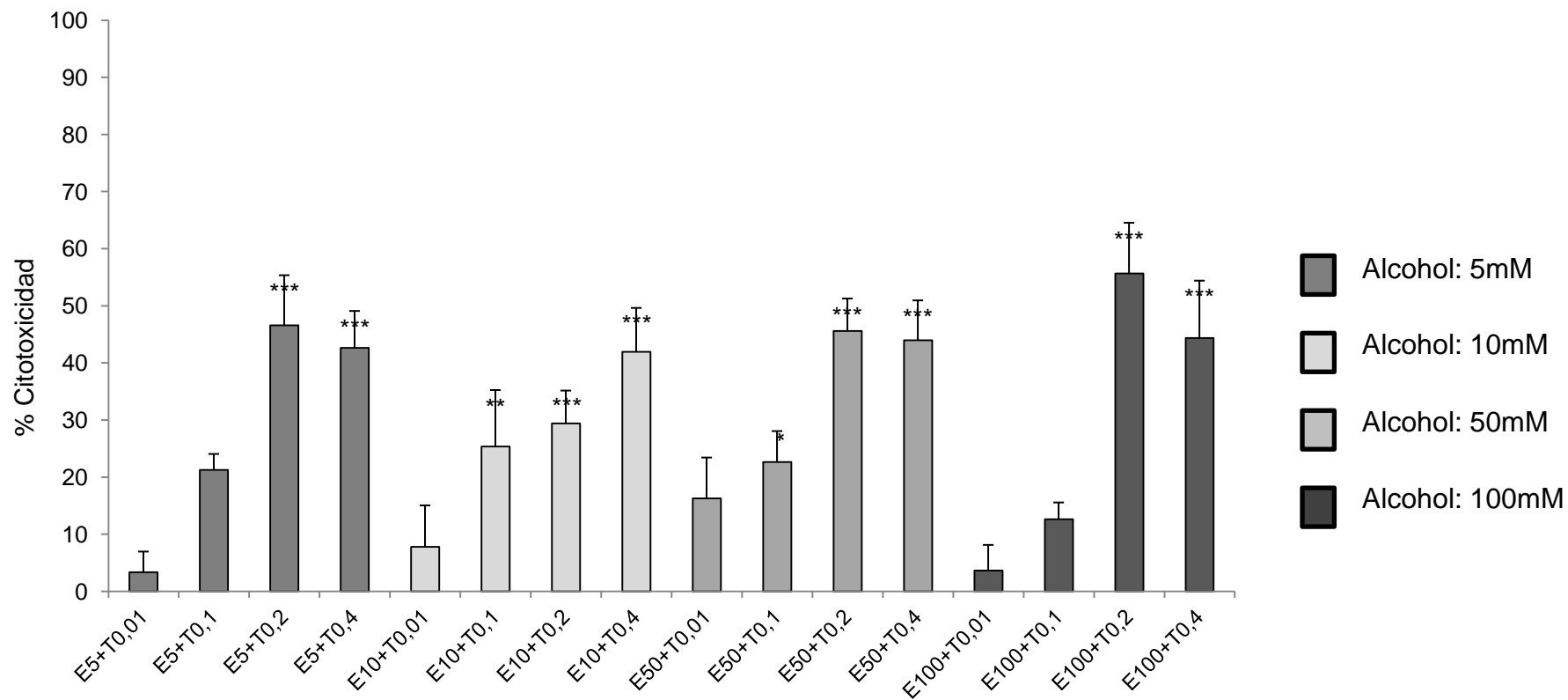
**Figura 29. Citotoxicidad (%) de las PSC en respuesta a tabaco (A) y microfotografías de PSC (B) tras 48 horas de incubación.** (A) El tabaco a concentraciones de 0,1; 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,1; T0,2 y T0,4 respectivamente) tienen un efecto tóxico sobre las PSC. Los valores representan porcentaje vs control células lisadas  $\pm$  error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento) (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (B) Microfotografías (10x) de PSC tras el tratamiento con tabaco 0,1; 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,1; T0,2 y T0,4 respectivamente) en comparación con el control negativo (C) tras 24 horas en cultivo.

## Ensayo de Liberación de LDH - 24 HORAS



**Figura 30. Citotoxicidad (%) de las PSC en respuesta a alcohol en combinación con tabaco a las 24 horas de incubación.** El tabaco a concentraciones de 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,2 y T0,4 respectivamente) en combinación con alcohol (5, 10, 50 y 100 mM; E5, E10, E50 y E100 respectivamente) tienen un efecto tóxico sobre las PSC. Los valores representan porcentaje vs control células lisadas (100%)  $\pm$  error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento) (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### Ensayo de liberación de LDH - 48 HORAS



**Figura 31. Citotoxicidad (%) de las PSC en respuesta a alcohol en combinación con tabaco a las 48 horas de incubación.** El tabaco a concentraciones de 0,1; 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,1; T0,2 y T0,4 respectivamente) en combinación con alcohol (5, 10, 50 y 100 mM; E5, E10, E50 y E100 respectivamente) tienen un efecto tóxico sobre las PSC. Los valores representan porcentaje vs control células lisadas (100%)  $\pm$  error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento) (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

A

Ensayo de liberación de LDH - 24 horas						
Tratamientos	Tabaco					
Alcohol		0	0,01mg/mL	0,1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
	0	0	4,1 ± 5,6	3,9 ± 14,2	48,3 ± 4,6***	38,5 ± 3,4***
	5mM	3,7 ± 5,3	1,7 ± 4,7	0,6 ± 15,4	40,6 ± 4,4***	40,7 ± 8,2***
	10mM	5,4 ± 4,1	10,7 ± 7,8	3,7 ± 2,2	41,9 ± 11,0***	42,5 ± 14,6 ***
	50mM	7,5 ± 7,5	8,2 ± 10,04	10,6 ± 4,7	43,0 ± 9,9***	30,2 ± 5,7**
	100mM	6,3 ± 11,6	8,5 ± 2,9	1,2 ± 6,6	40,1 ± 7,8***	39,9 ± 17,6***

B

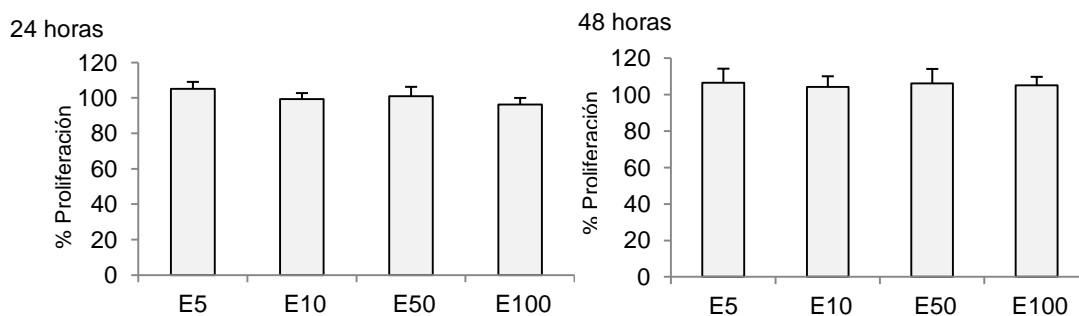
Ensayo de liberación de LDH - 48 horas						
Tratamientos	Tabaco					
Alcohol		0	0,01mg/mL	0,1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
	0	0	6,2 ± 5,6	28,6 ± 2,4**	46,9 ± 2,9***	40,8 ± 5,8***
	5mM	0,6 ± 3,2	10,1 ± 7,6	13,5 ± 11,6	39,3 ± 3,7***	37,3 ± 2,7***
	10mM	0,3 ± 3,4	2,1 ± 4,6	32,0 ± 9,3***	29,4 ± 7,0**	35,8 ± 4,6***
	50mM	13,6 ± 15,4	20,0 ± 6,7	11,9 ± 7,7*	41,3 ± 4,3***	41,9 ± 9,9***
	100mM	10,1 ± 13,6	0,3 ± 3,3	11,2 ± 3,7	34,9 ± 18,2***	36,6 ± 6,8***

**Tabla4.Resultados ensayo LDH.** Porcentaje de citotoxicidad en respuesta a alcohol, tabaco y ambos tóxicos por separado tras 24 horas (A) y 48 horas (B) de incubación. Los resultados se muestran como media ± error típico. N=5 en cada grupo. (\*p<0,05;\*\*<0,01\*\*\*p<0,001).

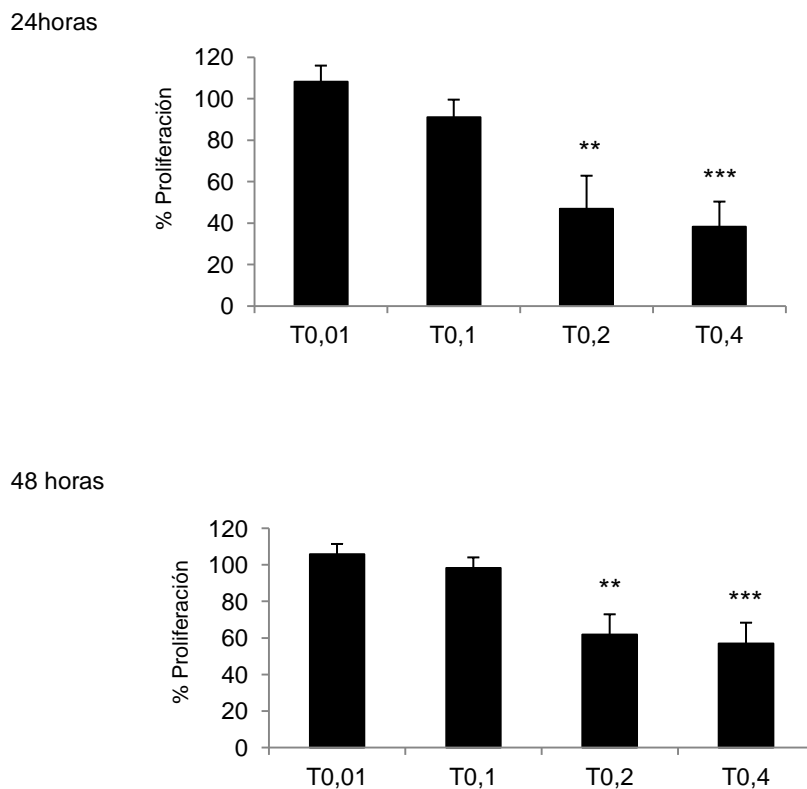
## 2.2. Análisis de proliferación

La proliferación de las PSC es un proceso fundamental en la fibrogénesis pancreática. Se utilizaron dos métodos para su estudio, a tiempo final usando un método de reducción de sales de tetrazolium a formazán en la mitocondria celular(WST-1) y a tiempo real usando el equipo xCELLigence. Además el test colorimétrico WST-1 se utilizó para corroborar el efecto tóxico de las distintas concentraciones de tabaco y alcohol.

La exposición a concentraciones de 0,2 o 0,4 mg/mL de tabaco sólo (Figura 33; Tabla 5) o en combinación con alcohol (Figuras 34 y 35; Tabla 5) provoca una disminución del ratio de la proliferación de las PSC asociada al efecto tóxico del tabaco. Ni el alcohol ni el tabaco a dosis no citotóxicas, de forma independiente o combinados, estimulan la proliferación de las PSC a ninguna de las concentraciones estudiadas a las 24 o 48 horas de incubación (Figuras 32-35; Tabla 5).

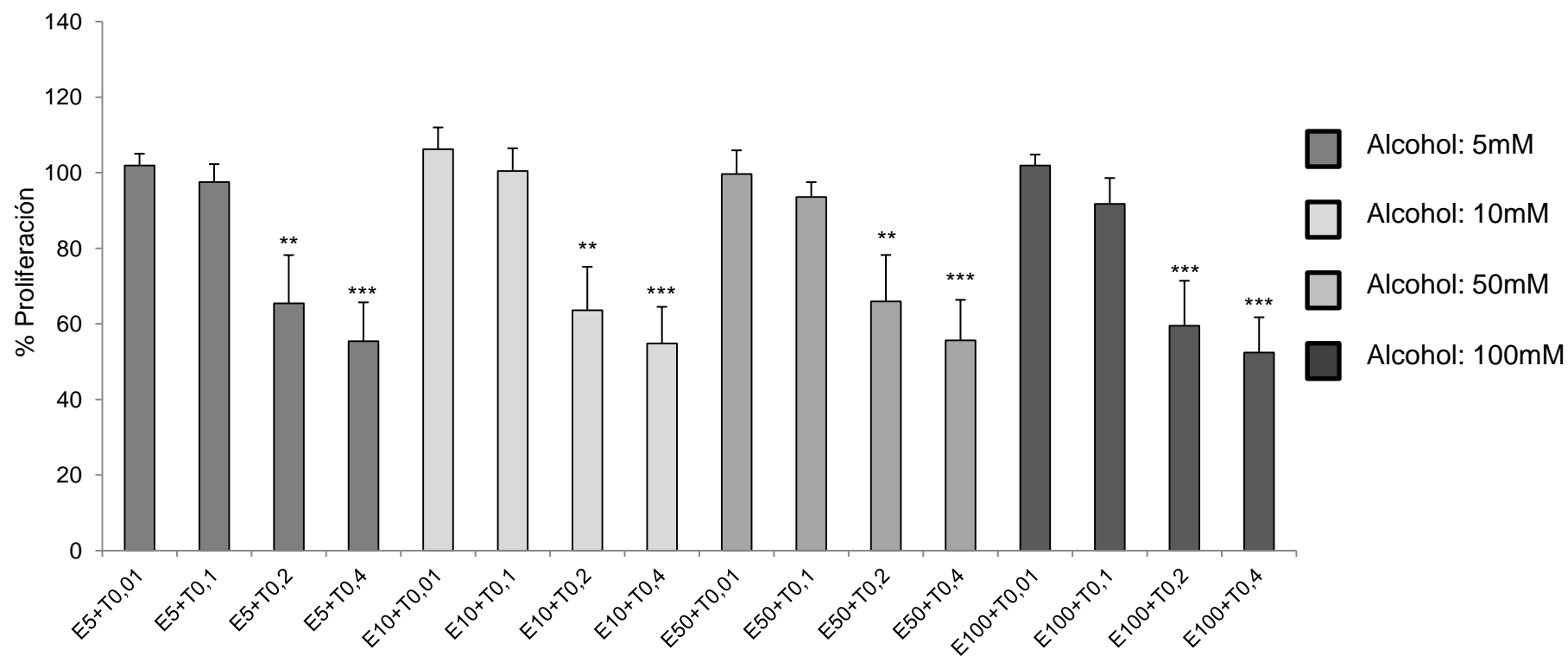


**Figura 32. Proliferación (%) de las PSC en respuesta a alcohol a las 24 horas y 48 horas. Ensayo WST-1.** El alcohol (5, 10, 50 y 100mM; E5, E10, E50 y E100 respectivamente) no estimula la proliferación de PSC a ninguna de las horas estudiadas. Los valores representan porcentaje vs control (sin tratamiento)  $\pm$ error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento).



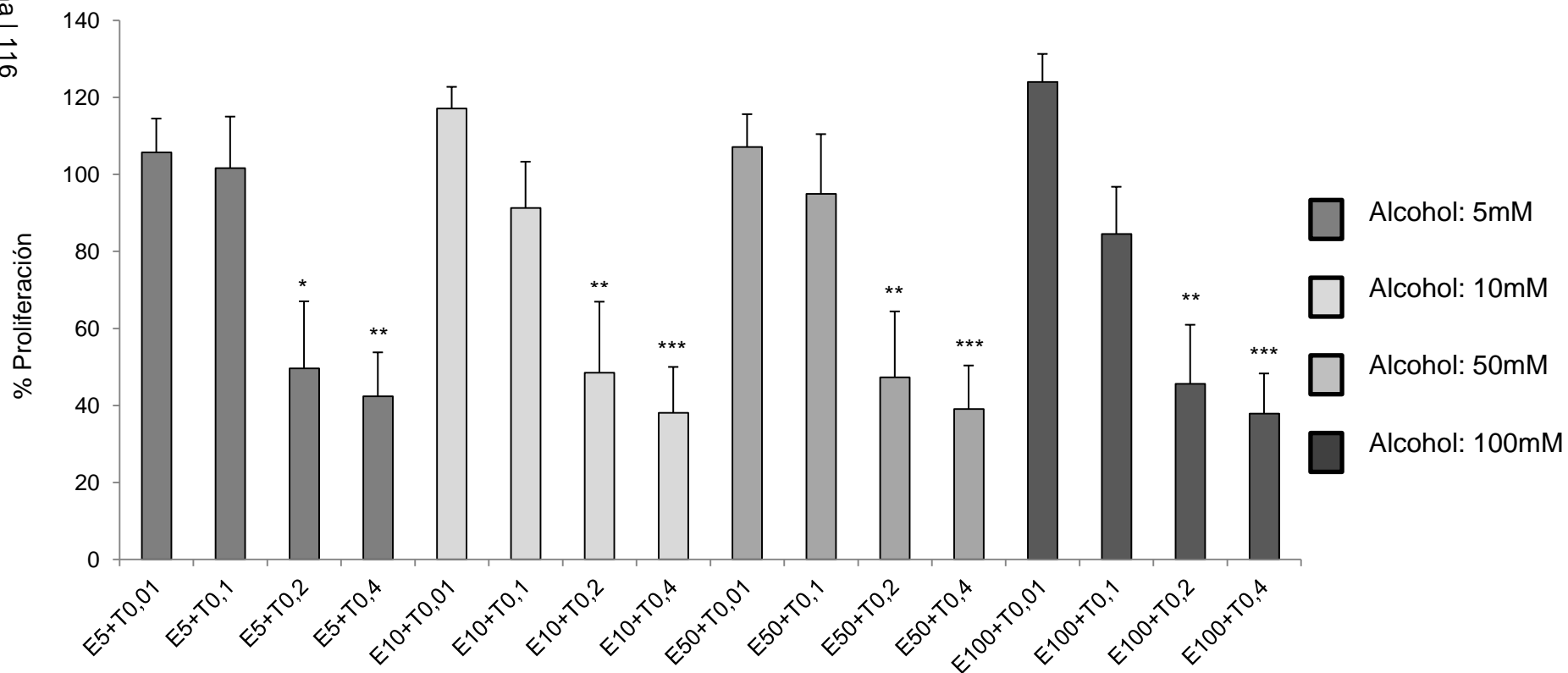
**Figura 33. Proliferación (%) de las PSC en respuesta a tabaco a las 24 horas y 48 horas. Ensayo WST-1.** El tabaco a concentraciones de 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,2 y T0,4 respectivamente) disminuye el ratio de proliferación de las PSC. Los valores representan porcentaje vs control (sin tratamiento con DMSO 0,01%)  $\pm$ error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento) (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

### WST1 - 24 HORAS



**Figura 34. Proliferación (%) de las PSC en respuesta a alcohol en combinación con tabaco a las 24 horas de incubación.** El tabaco a concentraciones de 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,2 y T0,4 respectivamente) en combinación con alcohol (5, 10, 50 y 100 mM; E5, E10, E50 y E100 respectivamente) tienen un efecto tóxico sobre las PSC, que se muestra como una disminución en el ratio de la proliferación. Los valores representan porcentaje vs control (células sin tratamiento con DMSO 0,01%)  $\pm$  error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (\*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001).

## WST1 - 48 HORAS



**Figura 35. Proliferación (%) de las PSC en respuesta a alcohol en combinación con tabaco a las 48 horas de incubación.** El tabaco a concentraciones de 0,2 y 0,4 mg/mL (T0,2 y T0,4 respectivamente) en combinación con alcohol (5, 10, 50 y 100 mM; E5, E10, E50 y E100 respectivamente) tienen un efecto tóxico sobre las PSC, que se traduce de una reducción en el ratio de la proliferación a las 48 horas de incubación. Los valores representan porcentaje vs control células control (células sin tratamiento con DMSO 0,01%)  $\pm$ error típico. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al control negativo (células sin tratamiento) (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

A

WST1 - 24 horas						
Tratamientos	Tabaco					
Alcohol		0	0,01mg/mL	0,1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
	0	100	108,3 ± 7,7	91,1 ± 8,4	46,8 ± 16,0**	38,2 ± 12,1***
	5mM	106,5 ± 7,8	105,7 ± 8,7	101,6 ± 13,4	49,6 ± 17,4**	42,3 ± 11,4***
	10mM	104,2 ± 5,8	117,1 ± 5,6	91,2 ± 12,0	48,5 ± 18,4**	38,1 ± 11,9***
	50mM	106,2 ± 7,9	107,1 ± 8,5	94,9 ± 15,5	47,3 ± 17,1**	39,1 ± 11,3***
	100mM	105,1 ± 4,7	123,9 ± 7,3	84,5 ± 12,3	45,6 ± 15,3***	37,9 ± 10,4***

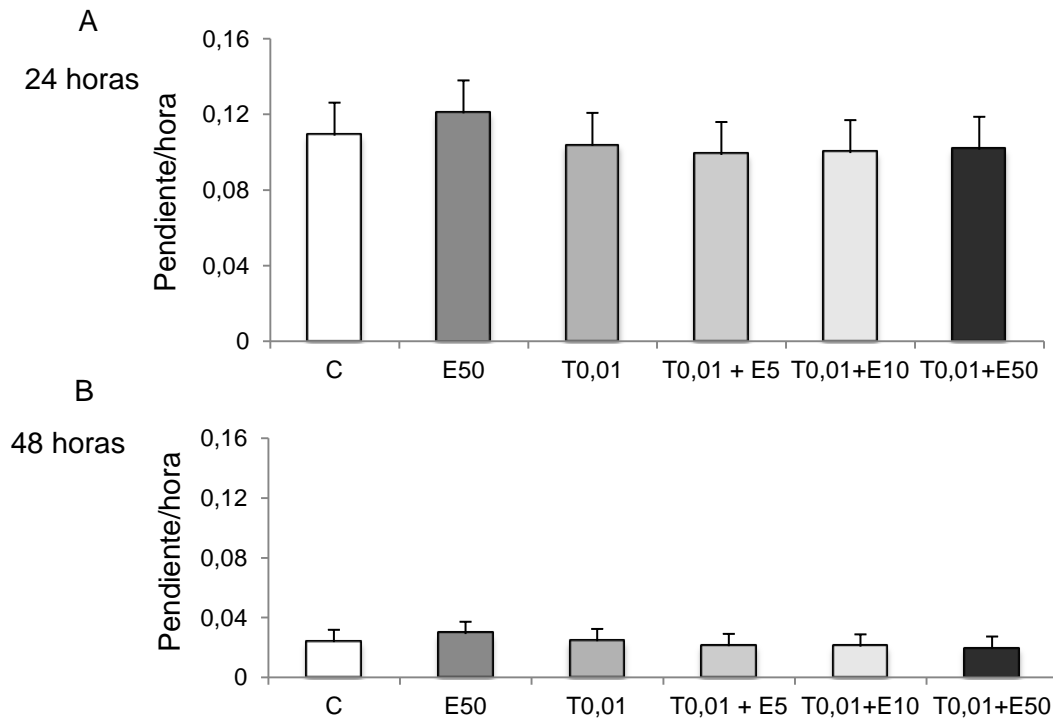
B

WST1 - 48 horas						
Tratamientos	Tabaco					
Alcohol		0	0,01mg/mL	0,1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
	0	100	105,8 ± 3,1	97,5 ± 5,8	65,5 ± 11,1**	55,4 ± 11,4***
	5mM	105,1 ± 4,0	101,9 ± 3,1	97,5 ± 4,7	65,5 ± 12,7*	55,4 ± 10,2**
	10mM	99,4 ± 3,4	106,2 ± 5,7	100,4 ± 6,0	63,6 ± 11,5**	54,8 ± 9,6***
	50mM	100,1 ± 5,4	99,6 ± 6,2	93,6 ± 3,9	65,9 ± 12,3**	55,6 ± 10,7***
	100mM	96,3 ± 3,7	101,9 ± 2,9	91,7 ± 6,9	59,5 ± 11,8**	52,4 ± 9,3***

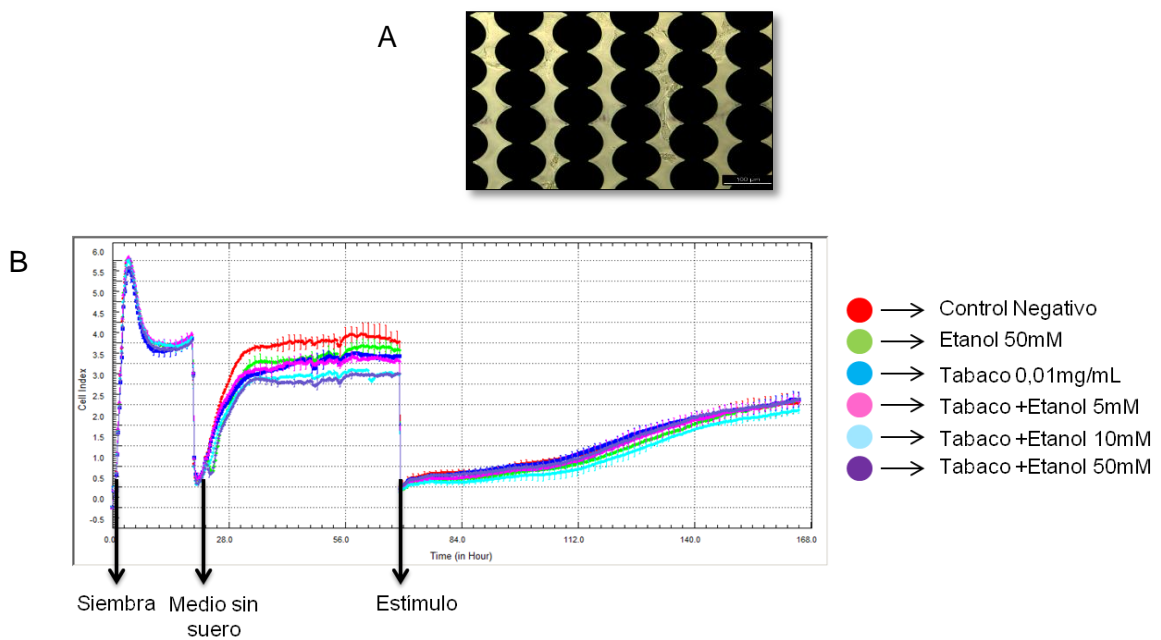
**Tabla5. Resultados ensayo WST1.** Porcentaje de proliferación en respuesta a alcohol, tabaco y ambos tóxicos por separado tras 24 horas (A) y 48 horas (B) de incubación. Los resultados se muestran como media ± error típico. N=5 en cada grupo. (\*<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Tras los ensayos de liberación de LDH y WST-1 se establecieron las concentraciones óptimas de ambos tóxicos para el estudio de su efecto sobre las PSCs. De esta forma se comprobó que concentraciones de tabaco de 0,1mg/mL o superiores sólo o en combinación con alcohol son tóxicas en un periodo de tiempo de 48 horas tras su adicción. Así pues, se eligió la concentración de tabaco de 0,01mg/mL y las concentraciones de etanol que son clínicamente relevantes 5, 10 y 50 mM.

Tras el ensayo de proliferación a tiempo real, se comprobó que concentraciones no citotóxicas de tabaco (0,01mg/mL) de forma independiente o en combinación con alcohol a concentraciones 5, 10 o 50 mM, no estimulan la proliferación en PSC a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 36 y 37).



**Figura 36. Resultados ensayo xCELLigence a las 24 horas (A) y 48 horas (B).** Los valores representan la pendiente/ hora desde la adición del tratamiento. El control (C: células sin tratamiento+DMSO al 0,01%), Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para determinar las diferencias entre los diferentes grupos, N=5 experimentos por grupo.



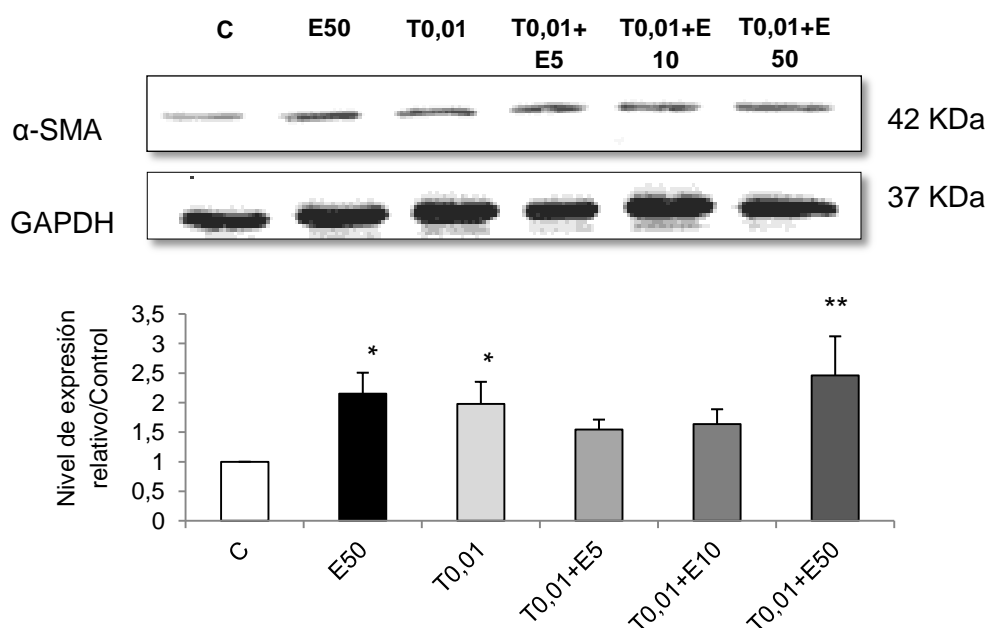
**Figura 37. EnsayoxCELLigence en PSC.** Imagen representativa de las PSC en la placa *E-plate* (A). Imagen representativa de un experimento de proliferación de PSC a tiempo real, en respuesta a los diferentes tratamientos (B).

### 3. Transdiferenciación de las células estrelladas como marcador del inicio del proceso de activación celular.

Para estudiar el efecto del tabaco de forma independiente o en combinación con el alcohol en la transdiferenciación de las PSCs se estudió la expresión de  $\alpha$ -SMA en cultivo temprano y primario de PSC tras un tratamiento con ambos tóxicos durante 24 horas.

#### 3.1. Transdiferenciación en cultivo primario

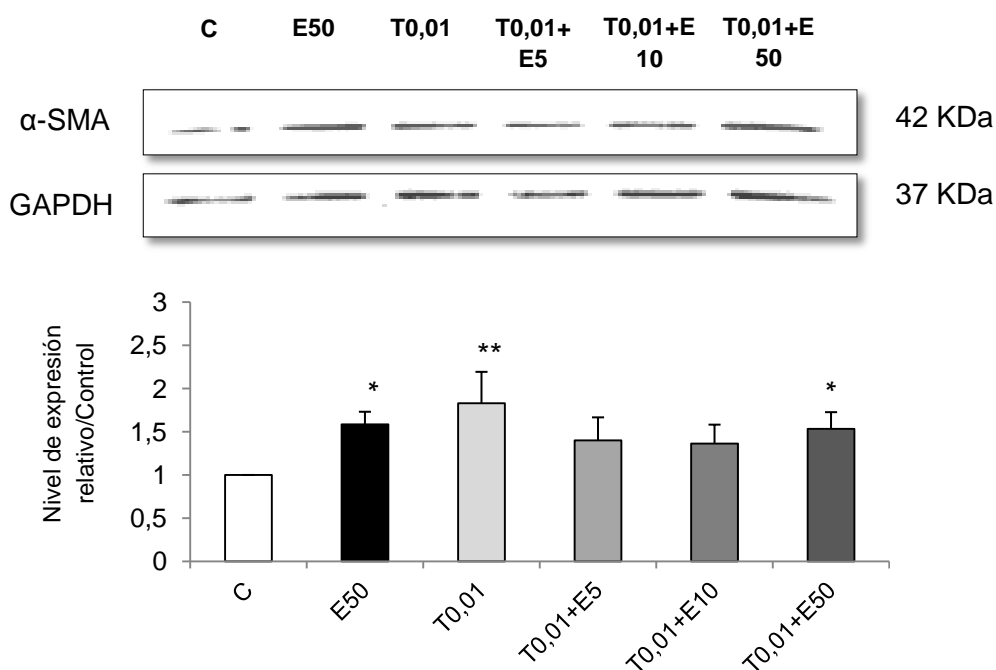
En cultivo primario de células estrelladas, tras 24 horas de incubación con los diferentes tratamientos, tanto el etanol sólo a una concentración de 50mM como el tabaco sólo a 0,01mg/mL estimulan el incremento de la expresión de  $\alpha$ -SMA  $2,15\pm 0,35$  veces ( $p=0,02$ ) y  $1,98\pm 0,37$  veces ( $p=0,04$ ) sobre el control negativo (células sin tratamiento+DMSO 0,01%) respectivamente. Además, la combinación de ambos tóxicos a esas dosis (0,01+E50) también incrementa la expresión de la proteína  $2,46\pm 0,66$  veces sobre el control negativo ( $p=0,004$ ), sin que se observe un efecto sinérgico entre ambos tóxicos (Figura 38).



**Figura 38. Análisis de expresión de  $\alpha$ -SMA en PSC.** Se muestran imágenes representativas de *western blot* de 5 experimentos de expresión de  $\alpha$ -SMA en PSCs tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). La intensidad relativa de cada banda se valoró mediante análisis de densitometría. Los resultados se expresan como veces de aumento respecto al grupo control (C), utilizando GAPDH como control de carga. Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

### 3.2. Transdiferenciación en cultivo temprano

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en cultivo primario y para evitar una posible interferencia del plástico del frasco de cultivo sobre el cambio de fenotipo de las PSC, se evaluó la expresión de  $\alpha$ -SMA en cultivo temprano. Al igual que en el cultivo primario, el alcohol a 50mM (E50) y el tabaco (0,01mg/mL; T0,01) de forma independiente o combinados (T0,01+E50) producen un incremento en la expresión de  $\alpha$ -SMA de  $1,58 \pm 0,15$  veces ( $p=0,26$ );  $1,83 \pm 0,36$  veces ( $p=0,003$ ) y  $1,53 \pm 0,19$  veces ( $p=0,04$ ) sobre el control negativo (células sin tratamiento +DMSO 0,01%) respectivamente, sin encontrar un efecto sinérgico entre el alcohol y el tabaco (Figura 39).



**Figura 39. Análisis de expresión de  $\alpha$ -SMA en PSC.** Se muestran imágenes representativas de *western blot* de 5 experimentos de expresión de  $\alpha$ -SMA en PSCs tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). La intensidad relativa de cada banda se valoró mediante análisis de densitometría. Los resultados se expresan como veces de aumento respecto al grupo control (C), utilizando GAPDH como control de carga. Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

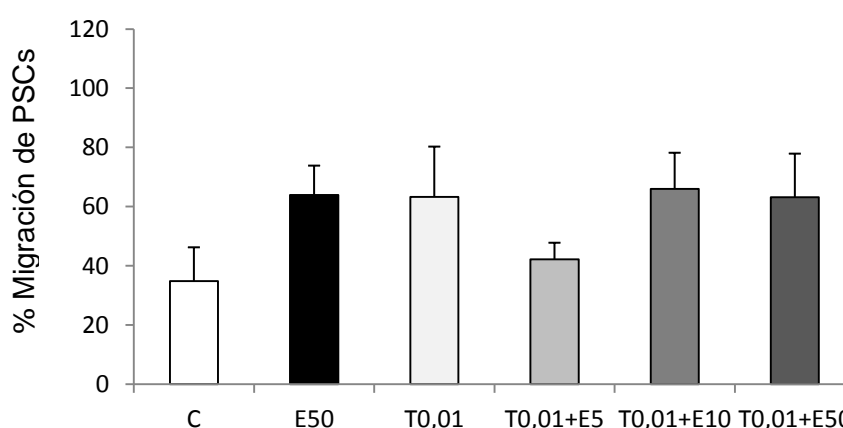
No es esencial una activación previa para que el alcohol o el tabaco ejerzan su efecto sobre las células estrelladas; es decir, tanto el alcohol como el tabaco por separado, o en combinación, son capaces de activar directamente la célula estrellada.

#### 4. Migración de las células estrelladas pancreáticas como un proceso fundamental en la fibrogénesis pancreática.

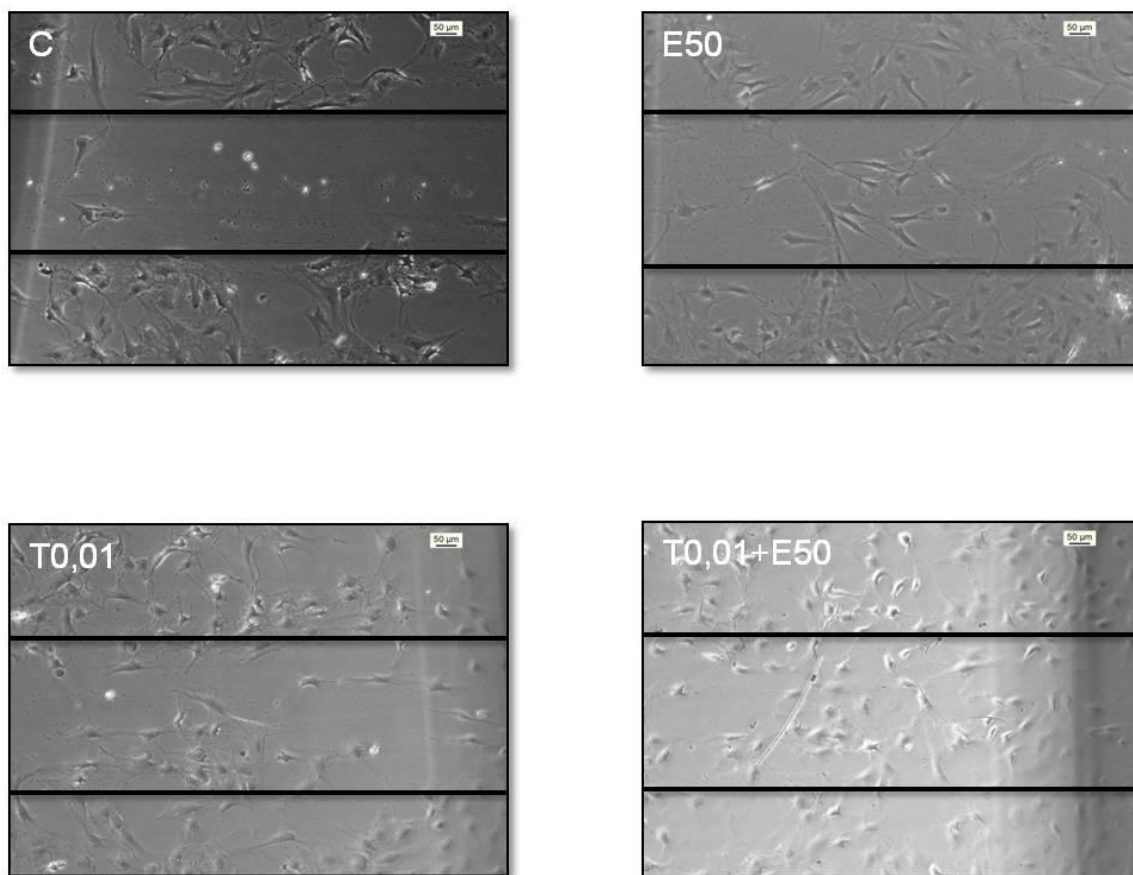
La capacidad de migración de las PSC tratadas con tabaco se estudió mediante dos aproximaciones experimentales.

##### 4.1. Migración mediante ensayo de cicatrización: *Wound Healing Assay* (WHA)

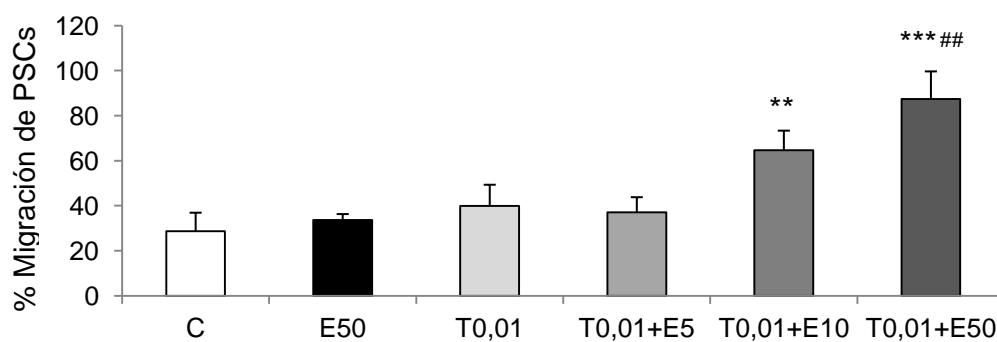
Tras la monitorización mediante el “ensayo de cicatrización de la herida” no hay diferencias en el porcentaje de células que migran a las 24 horas del tratamiento con ninguno de los tóxicos (Figura 40). Sin embargo, a las 48 horas de incubación las PSC con un tratamiento de tabaco 0,01mg/mL y alcohol a una concentración de 10 mM o 50mM (T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente) adquieren una capacidad de migración mayor en comparación con el control negativo (C; células sin tratamiento+DMSO 0,01%) ( $64,64 \pm 8,7$  en T0,01+E10 vs  $28,70 \pm 8,19$ ;  $p=0,02$ ) ( $87,47 \pm 12,21$  en T0,01+E50 vs  $28,70 \pm 8,19$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 41). Además, esta diferencia en el caso de la combinación de tabaco con alcohol 50mM es también significativa si se compara con la misma concentración de alcohol sólo ( $87,47 \pm 12,21$  en T0,01+E50 vs  $33,69 \pm 2,6$  E50;  $p=0,001$ ) (Figura 42).



**Figura 40. Migración (%) de PSC en WHA a las 24 horas.** Los resultados se muestran como media del porcentaje de células que migraron durante el ensayo WHA (n=5) en comparación sobre células tratadas con SFB (15%). Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas.



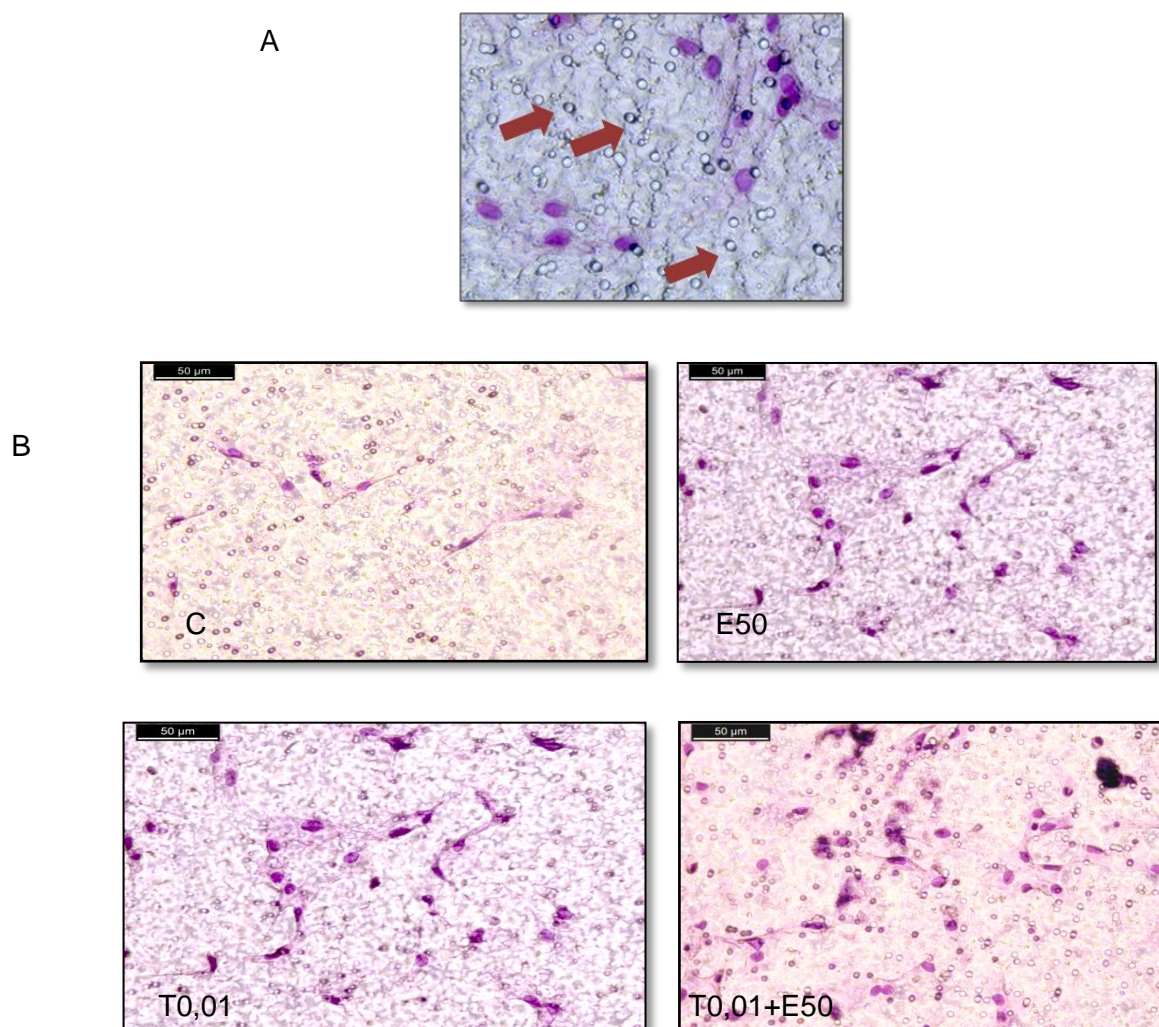
**Figura 41. Imágenes de WHA de PSC a las 48 horas.** Microfotografías representativas (20x) del ensayo WHA en células estrelladas tras 48 horas con el tratamiento. Control: células con medio + DMSO 0,01% (C), etanol a una concentración de 50mM (E50), tabaco 0,01mg/mL sólo (T0,01) o en combinación con 50mM de etanol (T0,01+E50). Las células que migraron se contaron mediante el software *Imagen J*.



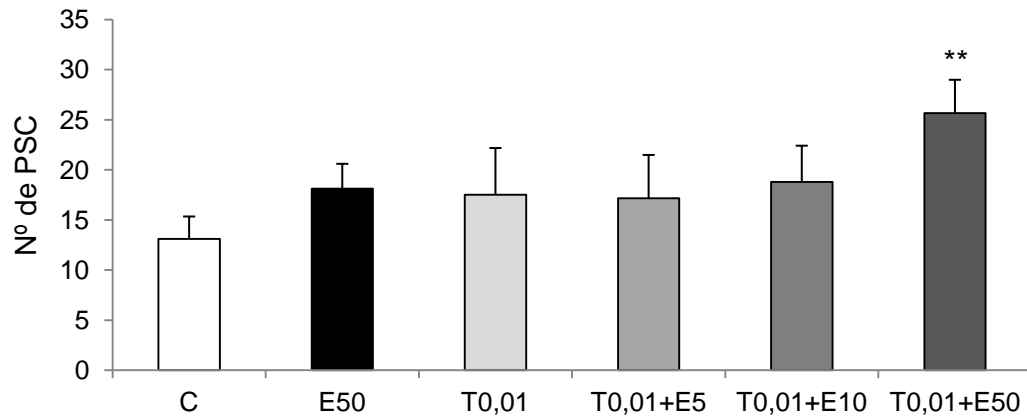
**Figura 42. Migración (%) de PSC en WHA a las 48 horas.** Los resultados se muestran como media del porcentaje de células que migraron durante el ensayo WHA (n=5) en comparación sobre células tratadas con SFB (15%). Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001) o frente al grupo de alcohol (E50) (##p<0,01).

#### 4.2. Migración: *Transwell*® Migration Assay

Los resultados del ensayo WHA se comprobaron mediante el ensayo *Transwell*® Migration Assay. Tras una incubación de 48 horas con los diferentes tratamientos, al igual que en ensayo de cicatrización, las células tratadas con tabaco 0,01mg/mL y etanol 50mM incrementaban su capacidad de migración con respecto al control negativo ( $13,09 \pm 2,24$  en el control vs  $25,67 \pm 3,30$  en T0,01+E50,  $p=0,007$ ), utilizando el mismo quimioatrayente en todos los casos (20%SFB) (Figuras 43y 44).



**Figura 43. Imágenes de TMA de PSC con tinción Giemsa las 48 horas.**(A)Zoom en una fotografía realizada con un microscopio óptico (20x) de PSC con tratamiento de tabaco a 0,01mg/mL. Las flechas indican los poros presentes en la membrana.(B) Microfotografías representativas de muestra del ensayo TMA de las PSC tras 48 horas con el tratamiento (10x). Células control (C); células tratadas con alcohol 50mM (E50); tratadas con tabaco 0,01mg/mL y tabaco combinado con 50mM de etanol (T0,01+E50). Las PSC que migraron se contaron mediante el software *ImagenJ*.



**Figura 44. Migración de PSC a las 48 horas en el ensayo *Transwell® MigrationAssay* (TMA).** Los resultados se muestran como la media del número de células que migraron durante el ensayo TMA a las 48 horas de incubación (n=5). Los resultados se expresan en % sobre el control negativo (C: Células sin tratamiento con DMSO 0,01%). Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\*\*p<0,01).

Por lo tanto las PSC tras ser activadas y en presencia de ambos tóxicos adquieren mayor capacidad de migración en respuesta a un agente quimioatrayente.

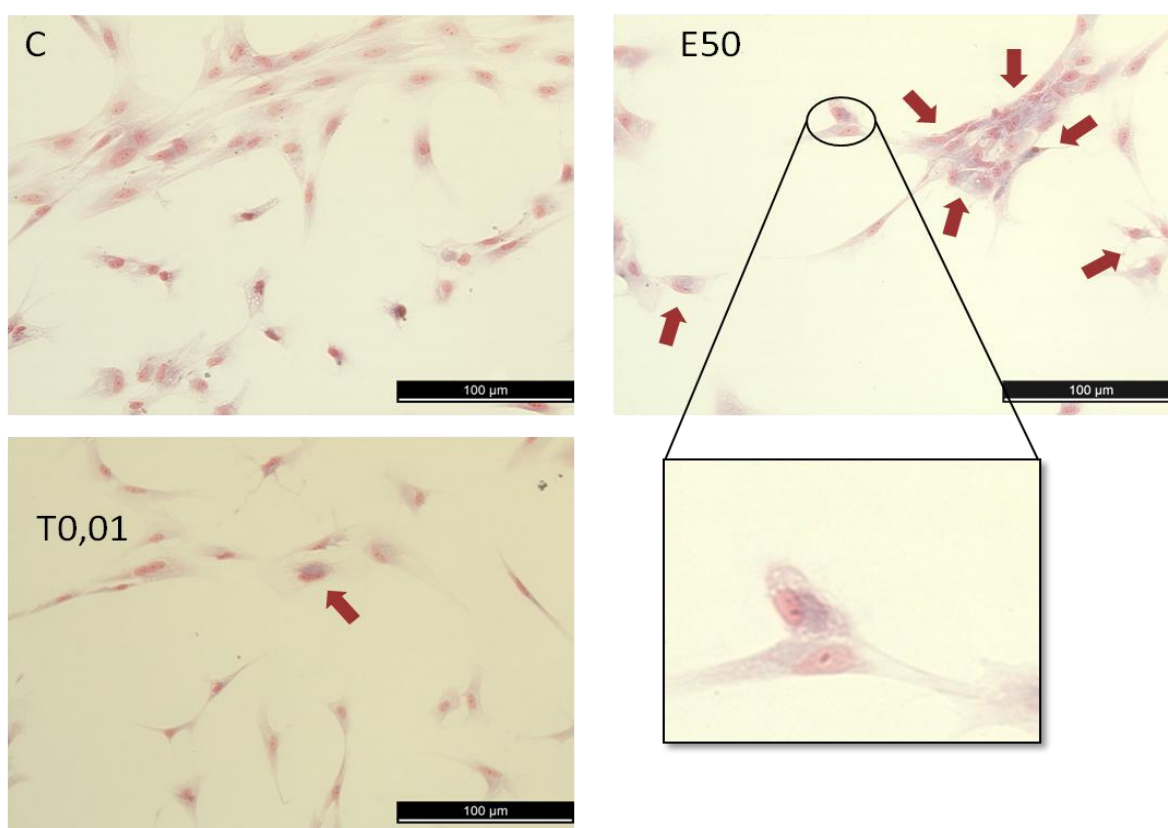
## 5. Expresión de proteínas de matriz extracelular como marcadores del desarrollo de fibrosis.

Para la determinación del grado de fibrosis producido por el efecto del tabaco sobre las células estrelladas pancreáticas, se cuantificó la expresión de las dos principales proteínas de matriz extracelular, la proteína estructural colágeno tipo I y la proteína de adhesión fibronectina 1.

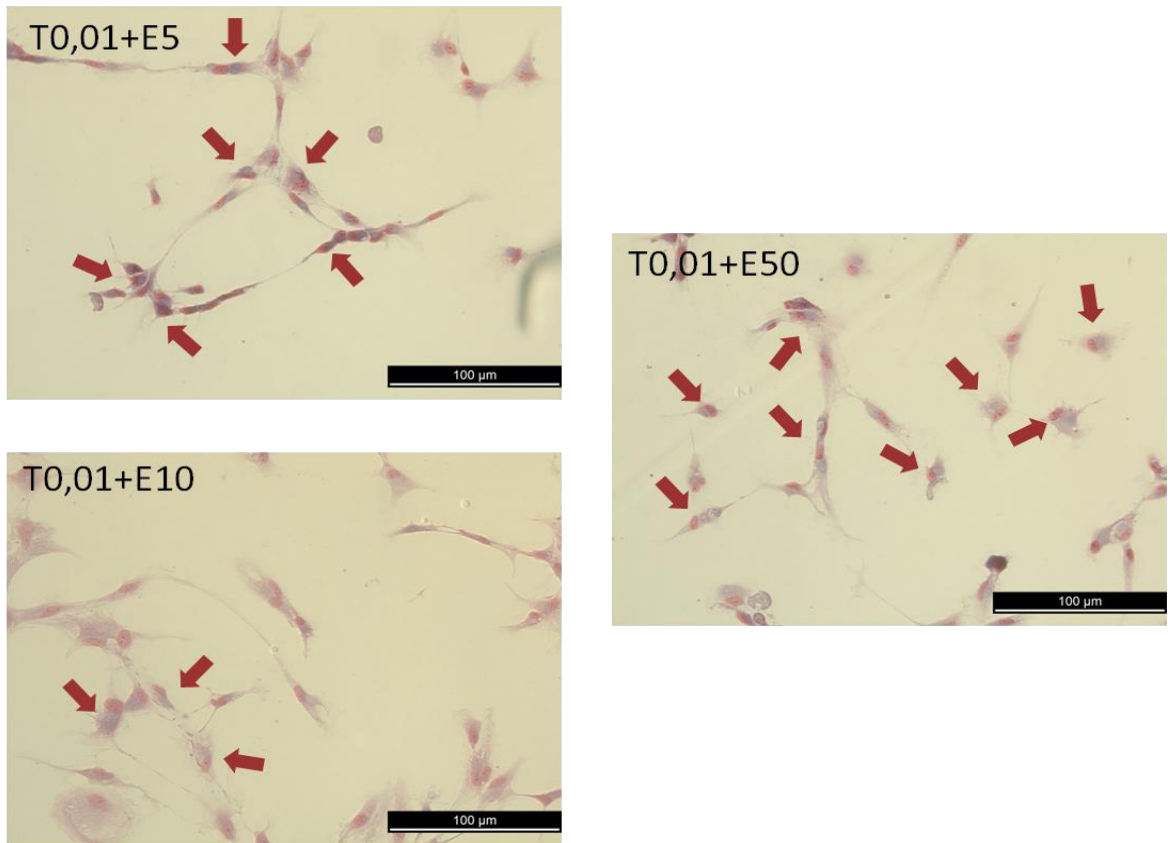
## 5.1. Expresión de colágeno tipo 1

### Tinción tricrómico de Masson

Las PSC en cultivo primario (pase 2) muestran un marcaje positivo para el colágeno tipo I tras un tratamiento durante 24 y 48 horas de etanol a una concentración de 50mM (E50) sólo, tabaco 0,01mg/mL (T0,01) (Figura 45) o la combinación de tabaco 0,01mg/mL con concentraciones crecientes de alcohol (5, 10 y 50mM de etanol; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente) (Figura 46) en comparación con el control negativo (células sin tratamiento +DMSO 0,01%). La tinción de las PSC muestra un patrón de distribución típico perinuclear.



**Figura 45.** Imágenes de tinción Tricrómico de Masson de PSC a las 24 horas. Microfotografías representativas de la tinción de colágeno I en PSC tras 24 horas con el tratamiento. Células control (C: células en medio con DMSO 0,01%); células tratadas con alcohol 50mM (E50). Las flechas indican la localización del colágeno I (azul).

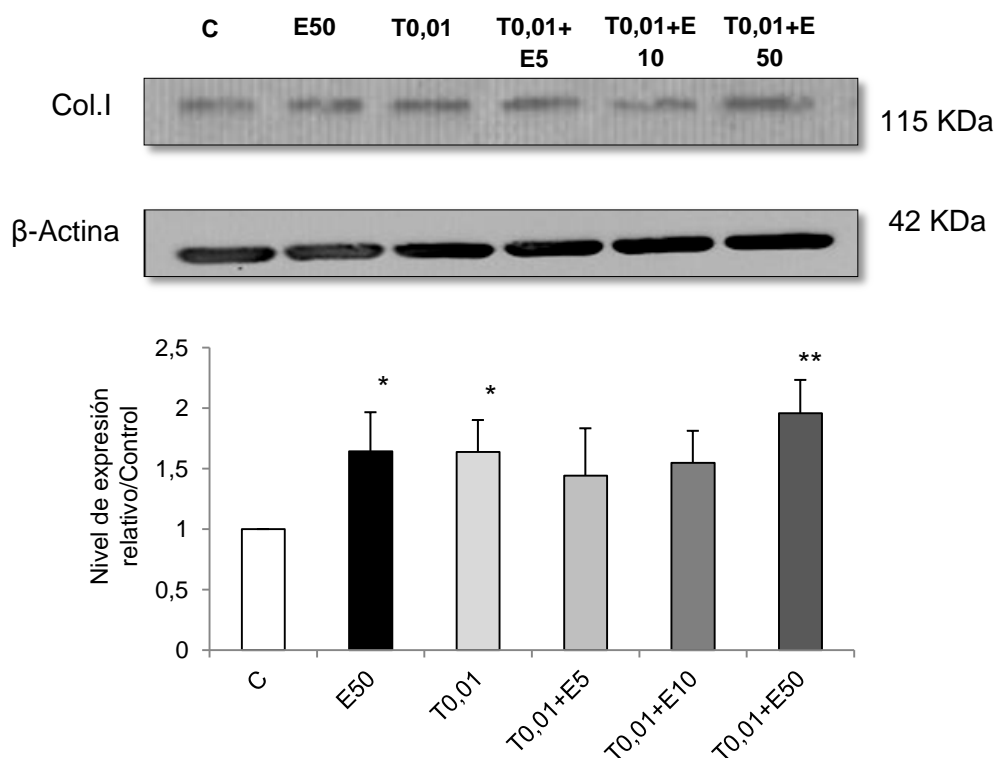


**Figura 46.** Imágenes de tinción Tricrómico de Masson de PSC a las 24 horas. Microfotografías representativas de la tinción de colágeno I en PSC tras 24 horas con el tratamiento. Tabaco 0,01mg/mL en combinación con concentraciones crecientes de alcohol 5, 10 y 50mM (T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50). Las flechas indican la localización del colágeno I (azul).

### **Inmunodetección mediante Western Blot**

Cuantificamos la expresión de colágeno I mediante inmunodetección por *western blot*. El alcohol 50mM (E50) y tabaco 0,01mg/mL (T0,01), de forma independiente, incrementan la expresión de colágeno I en un cultivo primario (Pase2) de PSC ( $1,64 \pm 0,32$  E50 vs C;  $p=0,018$ ) ( $1,64 \pm 0,26$  T0,01 vs C,  $p=0,022$ ) en comparación con el control negativo (C). Además, la combinación de ambos tóxicos, tabaco 0,01mg/mL con 50mM de alcohol (T0,01+E50), también produce un incremento significativo de la expresión de colágeno I en comparación con el control negativo (C) a las 24 horas ( $1,96 \pm 0,27$  T0,01+E50 vs C;  $p=0,001$ ) (Figura 47). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la

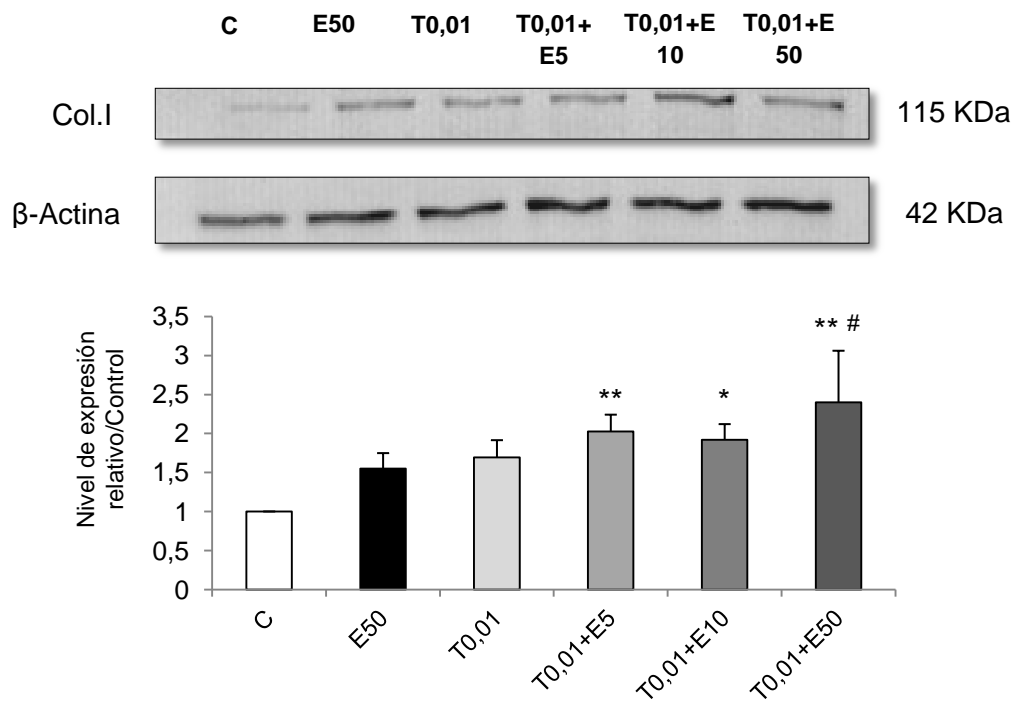
expresión de colágeno I en respuesta a tabaco en combinación con alcohol 10mM y 5mM.



**Figura 47. Análisis de expresión de colágeno I en PSC a las 24 horas.** Se muestran *western blot* representativos de 5 experimentos de expresión de colágeno I en PSCs tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). La intensidad relativa de cada banda se valoró mediante análisis densitométrico. Los resultados se expresan como veces de aumento respecto al grupo control (C), utilizando  $\beta$ -Actina como control de carga. Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Al aumentar el tiempo de incubación hasta 48 horas, se observó que la combinación de 0,01mg/mL de tabaco con cualquiera de las concentraciones crecientes de etanol 5, 10 o 50mM (T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente) estimula la expresión de colágeno tipo I en comparación con el control negativo (C) ( $2,03 \pm 0,21$  T0,01+E5 vs C;  $p = 0,009$ ) ( $1,92 \pm 0,20$  T0,01+E10 vs C;  $p = 0,018$ ) ( $2,4 \pm 0,66$  T0,01+E50 vs C;  $p = 0,001$ ) en

cultivo primario de PSC. Por otra parte, el tratamiento combinado de ambos tóxicos (T0,01+E50) es significativamente superior en comparación con la misma dosis de alcohol sólo (50mM)( $2,4 \pm 0,66$  vs  $1,55 \pm 0,19$ ;  $p=0,05$ ) (Figura 48).



**Figura 48. Análisis de expresión de colágeno I en PSC a las 48 horas.** Se muestran *western blot* representativos de 5 experimentos de expresión de colágeno I en PSCs tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). La intensidad relativa de cada banda se valoró mediante análisis densitométrico. Los resultados se expresan como veces de aumento respecto al grupo control (C), utilizando  $\beta$ -Actina como control de carga. Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ) y con respecto al grupo E50 ( $\#p<0,05$ ).

## 5.2. Expresión de fibronectina-1

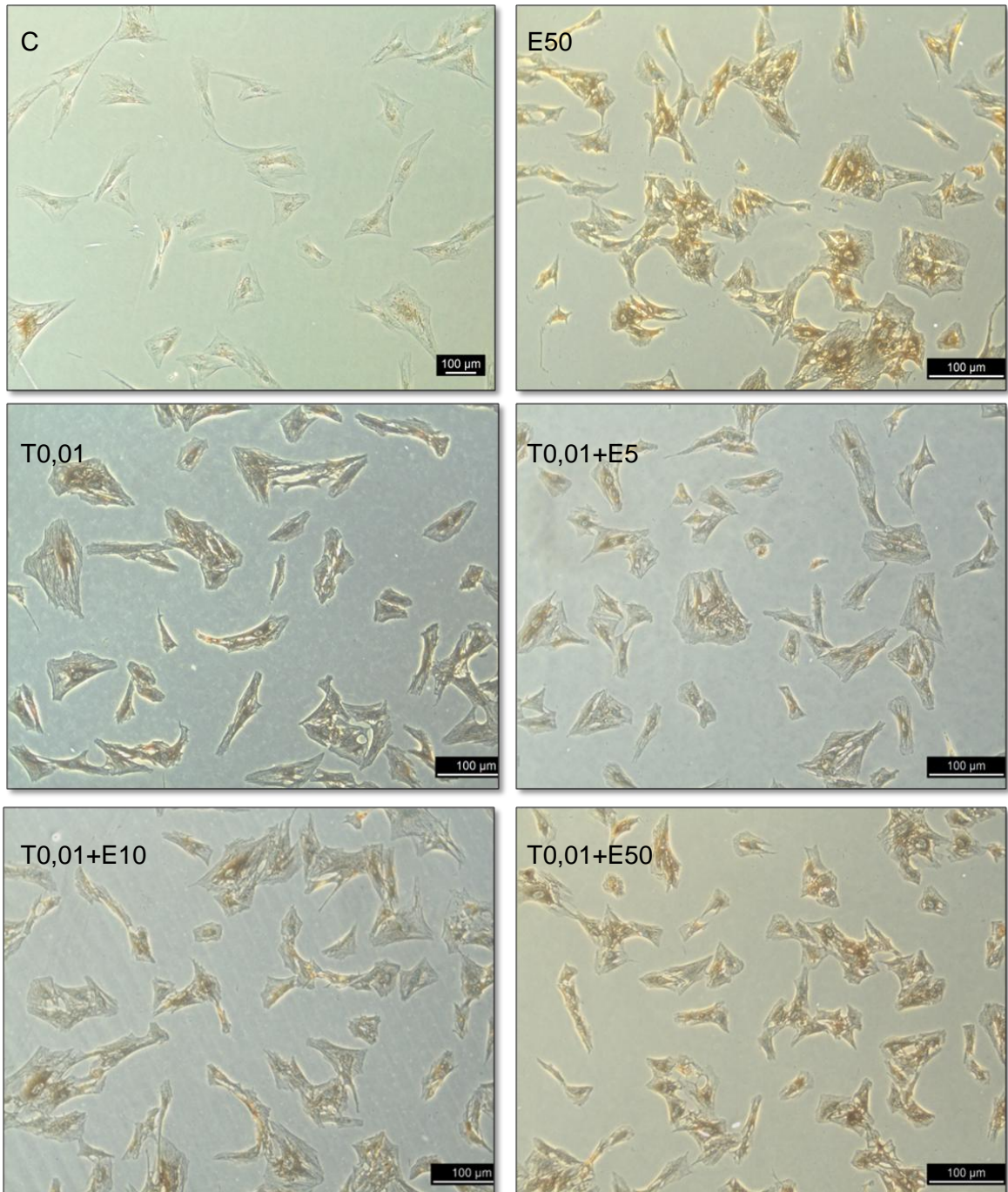
La expresión de la fibronectina-1 (FNT-1), se analizó mediante cuantificación de fibronectina I endógena por inmunocitoquímica (ICQ) y *western blot*.

### **Inmunocitoquímica**

Las PSC en el pase 2 del cultivo primario muestran un marcaje positivo para la fibronectina (FNT-1) tras el tratamiento con etanol 50mM (E50) sólo, tabaco 0,01mg/mL (T0,01) o la combinación de ambos tóxicos a concentraciones crecientes de alcohol (5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente) a las 24 y 48 horas en comparación con el control negativo (células sin tratamiento +DMSO). El patrón de distribución de la proteína FNT-1 endógena es típicamente difuso (Figuras 49 y 50).

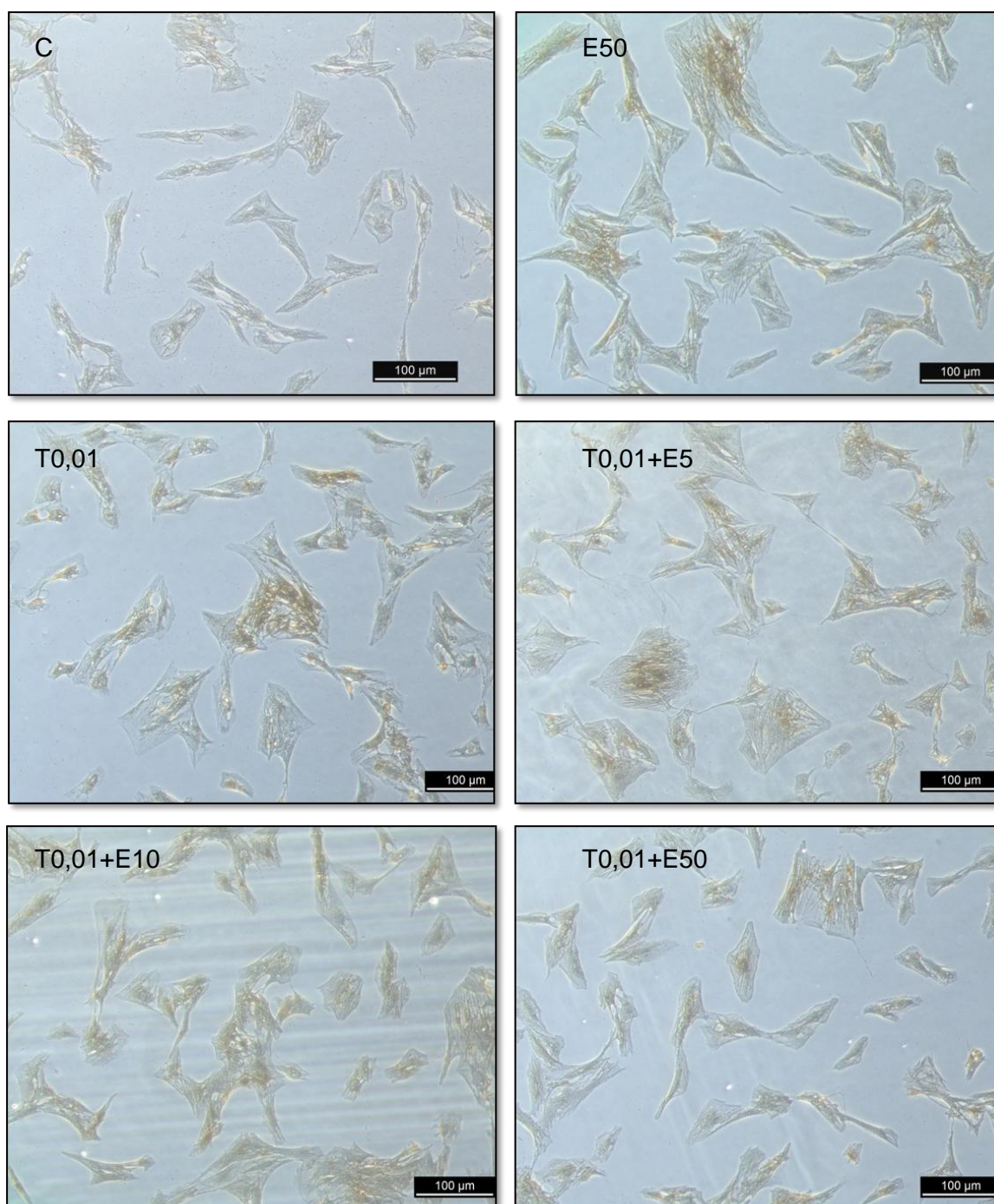
Tras la cuantificación del número de células positivas para el marcaje de FNT-1, se ha encontrado que las PSC tras 24 horas con el tratamiento de alcohol 50mM ( $41,18 \pm 11,40$  E50 vs  $17,17 \pm 3,34$  C;  $p= 0,006$ ) y el tabaco en combinación con 10mM ( $41,47 \pm 4,48$  T0,01+E10 vs  $17,17 \pm 3,34$  C;  $p=0,03$ ) y 50mM de etanol ( $45,89 \pm 4,87$  T0,01+E50 vs  $17,17 \pm 3,34$  C;  $p= 0,002$ ) tienen un marcaje positivo significativamente mayor en comparación con el control negativo. Por otra parte, a las 48 horas sólo el tratamiento con alcohol 50mM (E50) ( $51,62 \pm 3,37$  vs  $28,43 \pm 4,51$  C;  $p=0,02$ ) y la combinación de la misma dosis de alcohol con tabaco 0,01mg/mL ( $58,2 \pm 2,9$  T0,01+E50 vs  $28,43 \pm 4,51$  C;  $p= 0,005$ ) tienen un marcaje positivo significativamente mayor que el control negativo (C) (Figura 51).

24 Horas

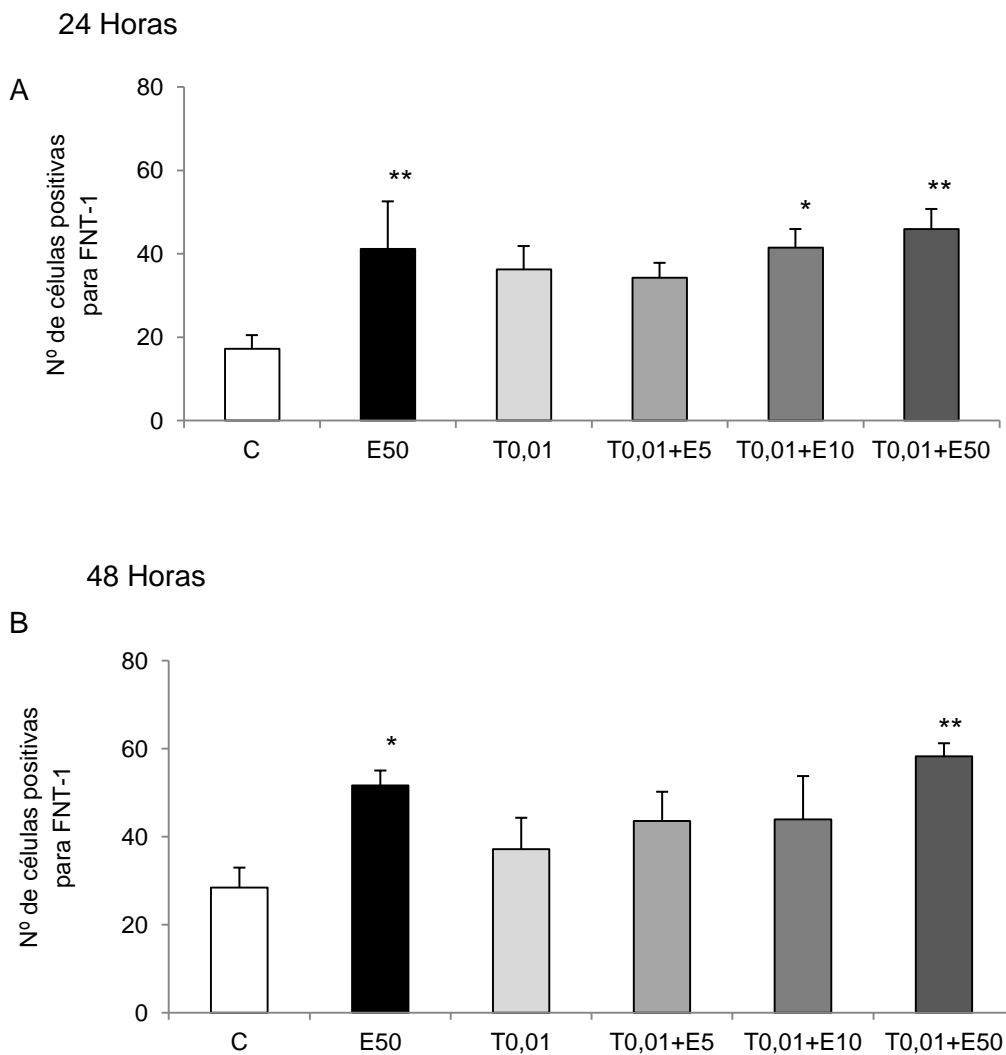


**Figura 49. Imágenes representativas de ICQ para FNT-1 en PSC a las 24 horas.** LasPSC fueron tratadas con de etanol (E50), 0,01mg/mL de tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (0,01mg/mL de tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). El control (C) son células con el vehículo del tabaco (DMSO 0,01%). El patrón de distribución de la FNT-1 endógena en las PSC es difuso (marrón).

48 Horas



**Figura 50. Imágenes representativas de ICQ para FNT-1 en PSC a las 48 horas.** Las PSC fueron tratadas con 50mM de etanol (E50), 0,01mg/mL de tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (0,01mg/mL de tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). El control (C) son células con el vehículo del tabaco (DMSO 0,01%). El patrón de distribución de la FNT-1 endógena en las PSC es difuso (marrón).

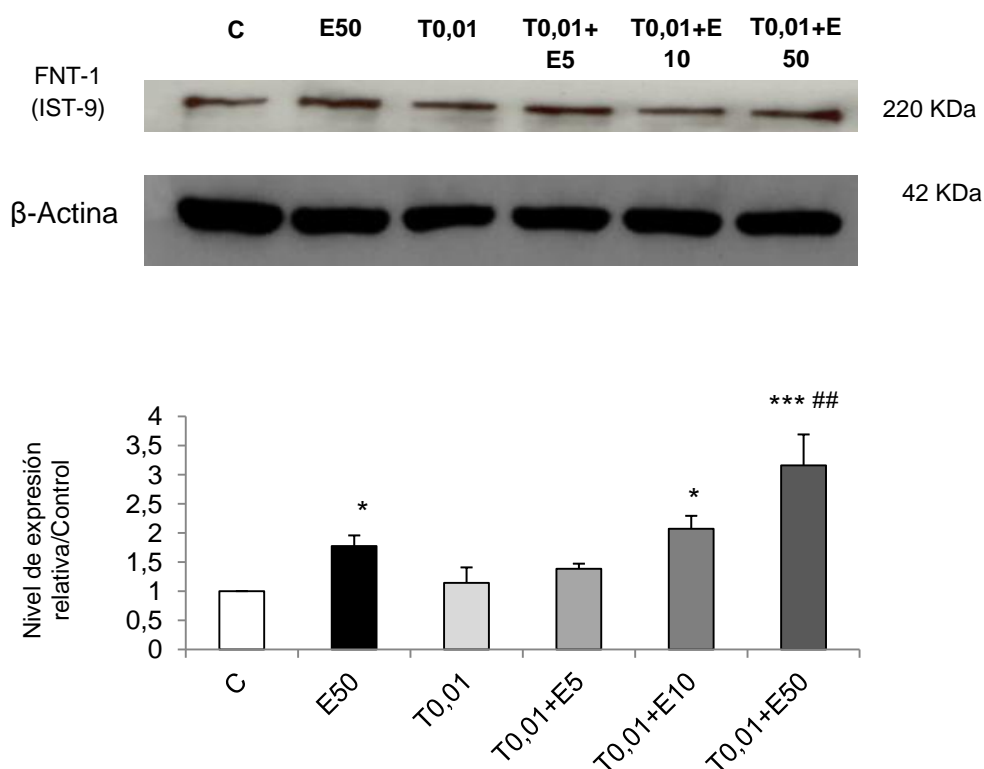


**Figura 51. Cuantificación de la ICQ para FNT-1 en PSC a las 24 horas (A) y 48 horas (B).** Los valores representan la media del número de células positivas de una  $n=5 \pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### Inmunodetección mediante *Western Blot*

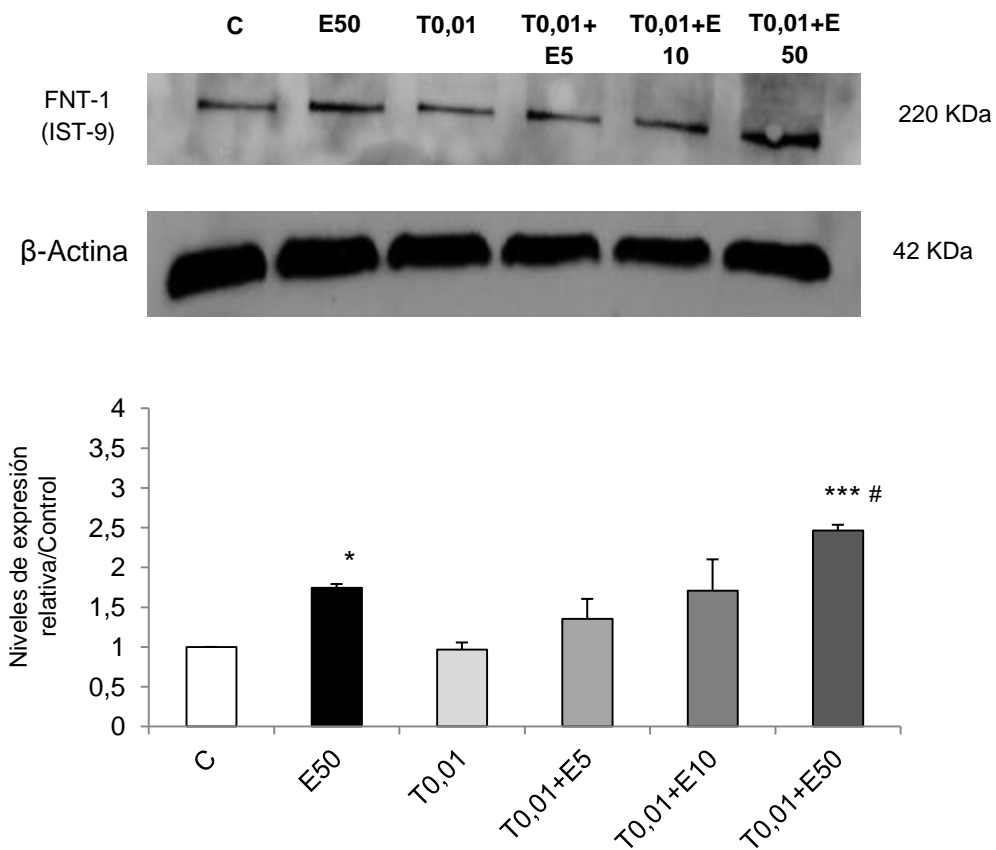
Se cuantificó la expresión de FNT-1 endógena mediante inmunodetección por *western blot*. Al igual que en la inmunocitoquímica, el tratamiento con alcohol a 50mM (E50)

( $1,77 \pm 0,18$ ;  $p=0,036$ ) y tabaco  $0,01\text{mg/mL}$  en combinación con  $10\text{mM}$  ( $2,07 \pm 0,22$  T0,01+E10;  $p=0,010$ ) y  $50\text{mM}$  de alcohol (T0,01+E50)( $3,16 \pm 0,53$ ;  $p<0,001$ ) incrementa la expresión de FNT-1 en comparación con el control negativo (C). Por otra parte, la expresión de FNT-1 tras el tratamiento T0,01+E50 es mayor en comparación con la misma dosis de alcohol sólo ( $50\text{mM}$ ) ( $3,16 \pm 0,53$  vs  $1,77 \pm 0,18$ ;  $p=0,003$ ) (Figura 52).



**Figura 52. Análisis de expresión de fibronectina-1 en PSC a las 24 horas.** Se muestran *western blot* representativos de 5 experimentos de expresión de FNT-1 en PSCs tratadas con  $50\text{mM}$  de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con  $5$ ,  $10$  o  $50\text{mM}$ ; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). La intensidad relativa de cada banda se valoró mediante análisis densitométrico. Los resultados se expresan como veces de aumento respecto al grupo control (C), utilizando  $\beta$ -Actina como control de carga. Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ) y con respecto al grupo E50 (# # $p<0,01$ ).

Al incrementar el tiempo de incubación hasta  $48$  horas, el alcohol a  $50\text{mM}$  ( $1,74 \pm 0,42$  E50;  $p=0,04$ ) y la combinación de la misma dosis de alcohol ( $50\text{mM}$ ) con tabaco  $0,01\text{mg/mL}$  ( $2,46 \pm 0,07$  T0,01+E50;  $p<0,001$ ) incrementa la expresión de FNT-1 en comparación con el control negativo (C) (Figura 53).



**Figura 53. Análisis de expresión de Fibronectina-1 en PSC a las 48 horas.** Se muestran *western blot* representativos de 5 experimentos de expresión de FNT-1 en PSCs tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). La intensidad relativa de cada banda se valoró mediante análisis densitométrico. Los resultados se expresan como veces de aumento respecto al grupo control (C), utilizando  $\beta$ -Actina como control de carga. Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) y con respecto al grupo E50 (#  $p < 0,05$ ).

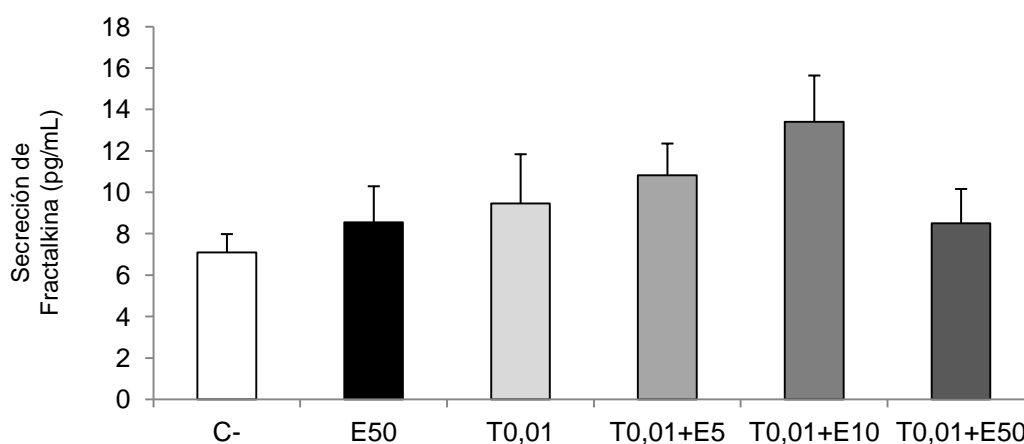
Además, se mantiene el efecto sinérgico entre alcohol y tabaco, de forma que en presencia de alcohol y tabaco la síntesis de proteínas de matriz extracelular es mayor que en presencia de cualquiera de los dos tóxicos por separado.

## 6. Liberación de moléculas inflamatorias e inductoras de fibrosis.

### 6.1. Expresión de fractalquina (FKN) mediante ELISA

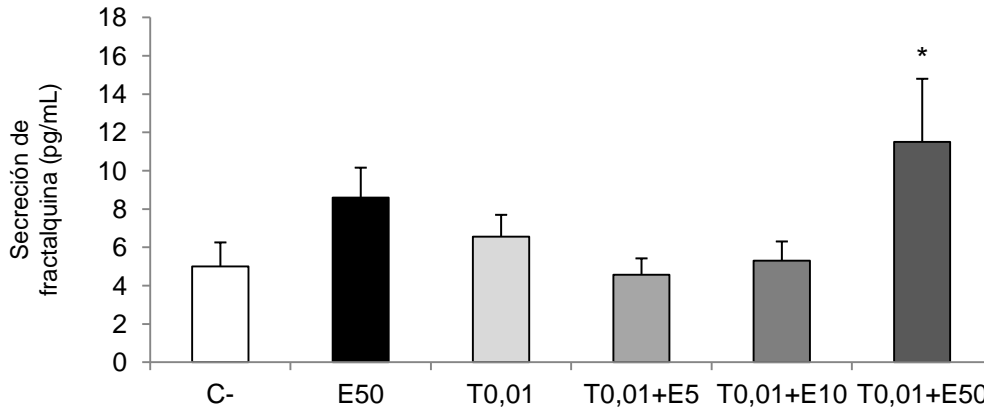
Como ya se ha explicado anteriormente, se cuantificó en sobrenadante celular mediante inmunoensayo enzimático la expresión de fractalquina como molécula proinflamatoria e inductora de fibrosis, con el fin de determinar la secreción de moléculas inflamatorias por parte de las células estrelladas en respuesta a tabaco y alcohol.

Se cuantificó la secreción de fractalquina en el sobrenadante celular de PSCs tratadas con etanol a 50mM (E50), tabaco a 0,01mg/mL (T0,01), y la combinación de tabaco con concentraciones crecientes de etanol 5, 10 y 50mM (T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50) durante 24 y 48 horas. Se utilizaron PSC tratadas con DMSO a la misma concentración que en el tabaco como control negativo (C). A las 24 horas no se observan diferencias significativas en la secreción de FKN (Figura 54).



**Figura 54. Análisis de secreción de fractalquina a las 24 horas.** No se han encontrado diferencias significativas en la secreción de fractalquina en las PSCs tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control.

Sin embargo, cuando se incubaron las PSC con los diferentes estímulos durante 48 horas, se observó que el tabaco a una concentración de 0,01mg/mL en combinación con 50mM de etanol, estimula la secreción de FKN en comparación con el control negativo ( $11,5\pm 3,3\text{pg/mL}$  vs  $5\pm 1,25$ ;  $p=0,017$ ) (Figura 55).

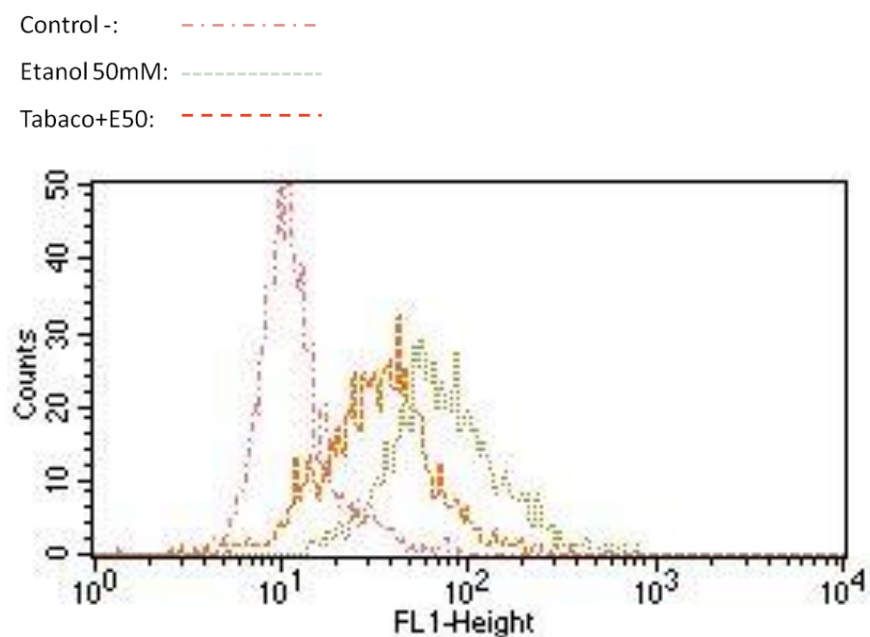


**Figura 55. Análisis de secreción de fractalquina a las 48 horas.** La gráfica representa los valores en pg/mL de fractalquina secretada por las PSC tratadas con 50mM de etanol (E50), tabaco (T0,01) o con la combinación de ambos tóxicos (tabaco con 5, 10 o 50mM; T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50 respectivamente). Los valores representan medias  $\pm$  error típico. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias significativas con respecto al grupo control (\* $p<0,05$ ).

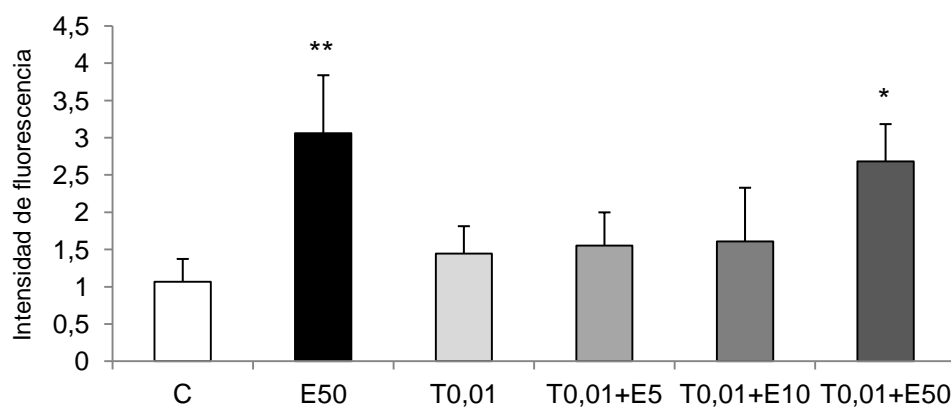
## 7. Producción de especies reactivas del oxígeno como efectores de la activación de las células estrelladas pancreáticas.

### 7.1. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Se estudió la producción de especies reactivas del oxígeno utilizando la sonda sensible a peróxido DCF-DA mediante citometría de flujo. El alcohol a una concentración de 50mM y la combinación de alcohol 50mM con tabaco 0,01 mg/mL incrementa la intensidad de fluorescencia producida por la presencia de especies reactivas del oxígeno a las 3 horas y media de incubación en comparación con el control negativo ( $1,06\pm 0,30$  en control (C) vs  $3,06\pm 0,77$  E50;  $p=0,008$ ) y ( $1,06\pm 0,30$  en control (C) vs  $2,68\pm 0,49$  T0,01+E50;  $p=0,027$ ) (Figura 56 y 57).



**Figura 56. Intensidad de fluorescencia para más de 6.000 células analizadas mediante citometría de flujo.** Las PSCs fueron incubadas con DCF-DA durante 30 minutos y tratadas con alcohol 50mM (E50) y la combinación de alcohol 50mM y tabaco 0,01mg/mL (T0,01+E50) durante 3 horas y media.



**Figura 57. Intensidad de fluorescencia para mas de 6.000 células analizadas mediante citometría de flujo.** Fluorescencia producida por peróxidos en PSCs tratadas con alcohol 50mM (E50), tabaco 0,01mg/mL (T0,01) y la combinación de ambos tóxicos tabaco 0,01mg/mL con 5, 10 y 50mM (T0,01+E5, T0,01+E10 y T0,01+E50) con respecto al control negativo (C). Los valores representan las medias de la intensidad de fluorescencia  $\pm$  error típico de  $n=4$  experimentos. Se aplicó el test ANOVA seguido de LSD para identificar las diferencias con respecto al grupo control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).



## *6. Discusión*



# Discusión

---

En el presente estudio se demuestra que el tabaco es capaz de ejercer un efecto relevante en el inicio y desarrollo de los procesos de fibrogénesis pancreática asociada a pancreatitis crónica. Concretamente se muestra que el tabaco sólo o combinado con alcohol produce la activación directa de las células estrelladas pancreáticas, estimula la migración de las mismas, la síntesis de proteínas de matriz extracelular (colágeno I y FNT-1), induce la secreción de fractalquina y la producción de especies reactivas del oxígeno en las PSCs. Además hemos comprobado que el tabaco y el alcohol tienen un efecto sinérgico, de forma que el tabaco podría ser un factor asociado al desarrollo de fibrosis en pancreatitis crónica de origen alcohólico.

La fibrosis pancreática es una respuesta a daño pancreático crónico causador por varios procesos (inflamación repetida o persistente, abuso del alcohol, malnutrición o traumatismo)(79). Al ser un proceso fisiológico en respuesta a daño, tanto la activación de las PSCs como la fibrosis son procesos dinámicos y reversibles en las primeras etapas(67). Por ello es necesario profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de los mecanismos de homeostasis de la matriz extracelular y en la caracterización de las PSCs como principales efectoras en el proceso de fibrogénesis, con el fin de buscar nuevas estrategias de prevención y tratamiento de los primeros estadios del desarrollo de fibrosis.

En la actualidad el alcohol se considera el principal factor de riesgo en el desarrollo de la pancreatitis crónica, y aunque el factor iniciador del daño pancreático desaparezca (inflamación, traumatismo u obstrucción biliar), si hay un consumo continuado de alcohol se mantiene el desarrollo de la enfermedad(181). De hecho, las fases finales de la PC de origen alcohólico se caracterizan por una extensa fibrosis y una total y permanente pérdida de tejido pancreático exocrino(90). Sin embargo, menos de un 10% de los alcohólicos desarrollan PC, lo que parece indicar que debe existir otro factor asociado que puede actuar de forma sinérgica con el alcohol en la progresión de la PC. En los últimos años, el tabaco aparece como factor independiente en el desarrollo de la PC, estando implicado también en los procesos de fibrosis de otros tejidos(198). Por ello, este trabajo se ha centrado en el estudio de los mecanismos por los que el tabaco de forma

independiente o combinada con el alcohol media el desarrollo de los procesos fisiopatológicos de fibrosis pancreática.

### *Diseño experimental*

Desde el año 1998 se conoce que las principales células efectoras de la fibrosis pancreática son las PSC(17,18). Así, estas células tienen un papel fundamental en la homeostasis del tejido. Con el fin de estudiar los efectos tóxicos del alcohol y el tabaco en el desarrollo de la fibrosis pancreática, en este trabajo se utilizaron dos tipos de cultivo de PSC con características morfológicas diferentes, el cultivo temprano y el primario. Para ambos se utilizó el mismo método de aislamiento, sin embargo el manejo posterior del cultivo fue diferente. El cultivo temprano ya había sido utilizado anteriormente por otros grupos para el estudio de la transdiferenciación de las PSC(82) ya que el propio plástico de los frascos de cultivo puede actuar como un factor de confusión en la expresión de  $\alpha$ -SMA(223). En concreto, para la realización del cultivo temprano fue necesario un elevado porcentaje de pureza celular y así evitar la contaminación con otros tipos celulares que pudieran interferir en los resultados. La prolongación del tiempo de digestión ensayado en este trabajo permitió mejorar los métodos anteriores consiguiendo un mayor número de células manteniendo la viabilidad y la pureza.

Con respecto a los tratamientos a estudio, como ya se ha indicado, las concentraciones de alcohol elegidas se consideran clínicamente relevantes y pueden ser extrapolables al consumo humano(180). La concentración más elevada de etanol (100mM) se ha asociado con eventos fibrogénicos en células estrelladas hepáticas(224), sin embargo, se eliminó posteriormente para el análisis debido a que no se observó ningún efecto significativo sobre las PSC al igual que en estudios anteriores(82,83).

En referencia al tabaco, su efecto tóxico sobre la salud humana se conoce desde hace más de 50 años. La nicotina es el alcaloide mayoritario del tabaco y por sí misma no es un carcinogénico sino que se considera un producto tóxico. La absorción de la nicotina a través de las membranas biológicas depende del pH, así se ha observado que se ioniza más y se absorbe menos cuanto más ácido sea el ambiente. Normalmente un cigarrillo contiene entre 10-14mg de nicotina y de estos es absorbido por el cuerpo entre 1-1,5mg. Después de la absorción, el tabaco se distribuye por todo el cuerpo con gran afinidad por

determinados tejidos como el hígado, riñón, bazo y pulmones(225). Los cigarrillos utilizados para la obtención del extracto líquido de tabaco en este trabajo, 3R4F, fueron diseñados para ser representativos del tabaco más consumido en EEUU (con 0,7mg de nicotina por cigarrillo). La fase denominada TPM (*Total Particulate Matter*; fase sólida de partículas) del extracto líquido de tabaco 3R4F está compuesta por los principales tóxicos, tales como la nicotina, fenoles, hidrocarburos cíclicos, nitrosaminas, y metales pesados y carcinógenos químicos como el N-nitrosaminasNNK. Cada cigarrillo 3R4F tiene un rendimiento de 11mg de extracto líquido por cigarrillo; teniendo en cuenta que en cada cigarrillo hay una cantidad de NNK de 85,5 ng(226), las concentraciones de tabaco utilizadas tenían una cantidad de NNK de un rango entre 0,08-3,10 ng/mL. Este rango se puede comparar a los niveles de NNK hallados en jugo pancreático de pacientes fumadores(227). En dicho estudio se analizaron los niveles de distintos metabolitos del tabaco en pacientes fumadores en jugo pancreático, sangre y orina y se compararon con los niveles de pacientes no fumadores. Concretamente, en el jugo pancreático el rango de concentración de NNK está entre 1,37-265 ng/mL sin encontrar una asociación dosis dependiente en función del número de cigarrillos consumidos (227). Por otra parte, con respecto a la nicotina como tóxico mayoritario presente en el tabaco, las concentraciones de extracto líquido de tabaco utilizadas (0,01-0,4 mg/mL) tiene unos niveles de nicotina de 3,8pM-156nM respectivamente, que se sitúan por debajo de las encontradas en sangre y plasma de pacientes fumadores (60-310µM) (228). Hay que tener en cuenta que una vez absorbida, la nicotina se distribuye por el cuerpo y su metabolización ocurre principalmente en el hígado, por lo tanto la cantidad de nicotina que se acumula en el páncreas es mucho menor que la que se encuentra en sangre o plasma(225). En base a estos datos, en el presente trabajo, se utilizaron concentraciones que entran dentro del rango del consumo humano.

Teniendo en cuenta que el páncreas exocrino es muy sensible a la toxicidad del tabaco(229), se realizó un estudio previo con el fin de determinar el efecto tóxico de las concentraciones elegidas sobre las PSC. Se observó que concentraciones superiores a 0,1mg/mL de tabaco tienen un efecto tóxico sobre las PSCs. Así, la disminución del ratio de proliferación con el ensayo de WST-1 corrobora los resultados obtenidos en el ensayo de liberación de LDH. Se observaron efectos citotóxicos similares en otros tipos celulares como células endoteliales humanas (HUVECs) y en líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas, donde existe una citotoxicidad de más del 30% tras la adicción de 0,2mg/mL de extracto líquido de tabaco tras 24 horas de incubación(230,218).Sin

embargo, con respecto a la concentración de 0,1mg/mL de tabaco, no existen datos comparables en los trabajos mencionados ya que el efecto tóxico sobre las PSCs se observa tras 48 horas de incubación. Debido a la gran similitud entre las células estrelladas pancreáticas y hepáticas (HSC), de hecho sólo difieren en la expresión de 29 genes(19), es razonable comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados de estudios previos sobre las HSC. Así, los niveles de nicotina que poseen las concentraciones de tabaco utilizadas en el presente estudio (3,8pM-156nM) entran dentro del rango de nicotina utilizado en un estudio realizado sobre HSC humanas(202). En dicho estudio examinan un amplio rango de nicotina (1pm-1mM) sin encontrar efecto tóxico alguno sobre las HSC(202). A diferencia de lo que ocurre en el hígado, en nuestro trabajo se observó que las PSC son muy sensibles a la toxicidad producida por el tabaco poniendo de manifiesto la susceptibilidad del páncreas exocrino al tabaco.

Basándonos en los resultados de estos ensayos, elegimos la concentración de 0,01mg/mL de tabaco, que tiene una concentración de nicotina de 3,8pM, para posteriores estudios.

Con respecto a los test estadísticos utilizados, se aplicó el test de análisis de la varianza (ANOVA) seguido de LSD para establecer las diferencias entre los distintos tratamientos y los controles. Todos los datos siguen una distribución normal (análisis Kolgomorov Smirnov), y aunque el número de datos es menor que 30, lo que no nos permitiría utilizar el test ANOVA, se decidió, finalmente su uso, ya que el análisis post hoc de un método no paramétrico (H de Kruskall Wallis) no era lo suficiente restrictivo entre los distintos casos.

#### *Estudio de expresión de $\alpha$ -SMA y producción de proteínas de matriz extracelular.*

El cambio de fenotipo de las PSCs de su estado quiescente a estado activado, y la producción de proteínas de matriz como el colágeno fibrilar (tipo I y III) y la fibronectina durante la fibrogénesis pancreática, son procesos fundamentales para que se desarrolle fibrosis(87). La proteína citoplasmática  $\alpha$ -SMA (actina alfa de músculo liso) se considera un marcador excelente de este proceso de transdiferenciación(17,18). Además, esta proteína se puede utilizar como marcador para distinguir las PSC de los fibroblastos del páncreas (PFB), ya que estos últimos no expresan dicha proteína(231).

Está demostrado que tanto el etanol como su producto de metabolización (el acetaldehído) a concentraciones clínicamente relevantes, producen la activación directa de las PSCs estimulando la producción de colágeno I tanto en humanos como en rata; y que este proceso está regulado al menos en parte a nivel transcripcional(80,232,233,82,83). Al igual que en estudios previos, los resultados del presente proyecto mostraron que tras 24 horas en cultivo el alcohol a 50 mM estimula la transdiferenciación de las PSC directamente desde su etapa quiescente, y estimula la producción de proteínas de matriz extracelular. En base a estos resultados, se utilizó como control de activación la dosis de 50mM de etanol.

Con respecto al tabaco a concentraciones no citotóxicas, sólo o en combinación con la dosis de etanol que se usó como control de activación, se vio que estimulaba la expresión de  $\alpha$ -SMA en células estrelladas pancreáticas. El incremento de expresión de esta proteína se traduce en la transformación de las PSCs a su fenotipo activado. Aunque los trabajos desarrollados hasta el momento en referencia al efecto del tabaco sobre los procesos de fibrogénesis son escasos, existen estudios que analizan el efecto de determinados componentes del tabaco, como la nicotina, sobre otros tipos celulares asociados a fibrosis(234,235,236). Un estudio realizado en fibroblastos de pulmón en cultivo primario de ratas tratadas con nicotina a dosis clínicamente relevantes, mostraba un incremento de expresión de  $\alpha$ -SMA, que se traducía en la diferenciación de los fibroblastos normales del pulmón a un fenotipo de tipo miofibroblasto(235).

Es importante destacar que las PSCs en cultivo temprano, sin que otros factores las preactiven, mostraron un incremento de expresión de  $\alpha$ -SMA tras exponerlas a tabaco sólo o a tabaco combinado con etanol. Este resultado sugiere que no es necesaria una activación previa para que cualquiera de los dos tóxicos ejerza su efecto sobre las PSCs. Por lo tanto es posible que se inicie el proceso de fibrogénesis en ausencia de inflamación o de otros factores iniciadores.

Un hallazgo fundamental en el presente trabajo es que el tabaco de forma independiente o combinada con etanol 50mM estimula la producción de colágeno I y de fibronectina (FNT-1) en PSCs activadas tras un tiempo de incubación de 24 y 48 h evaluado tanto por inmunocitoquímica como por *western blot*. Hasta la fecha no se había estudiado el papel del extracto líquido de tabaco o de algún componente del mismo en este contexto, sin embargo, existen estudios donde se analiza el papel de la nicotina en otros tipos celulares. Concretamente la nicotina estimula la activación de fibroblastos y la síntesis de

colágeno en varios órganos como el corazón(237,210), pulmón(235,211), en la encía(238,213), la próstata(212) y en las articulaciones(214). En cuanto a la fibronectina, en fibroblastos de pulmón la nicotina induce la acumulación de grandes depósitos de esta proteína en los pulmones de animales expuestos a tabaco, y esta inducción es dependiente de la actividad de proteína-quinasa y de elementos transcripcionales específicos del promotor del gen que codifica para fibronectina(239). Michaelson y colaboradores demuestran en un estudio *in vitro* que la nicotina induce la transcripción de fibronectina por actuación de los receptores  $\alpha 7$  nAChRs, a través de la fosforilación del factor de transcripción nuclear CREB, capaz de iniciar la expresión del gen de fibronectina(240). Otro estudio realizado en ratas, demostró que una exposición crónica a nicotina (9mg/kg/día durante 2 semanas) estimula la proliferación y la expresión de genes asociados a fibrosis hepática ( $\alpha$ -SMA, colágeno y fibronectina 1)(241).

Además del efecto independiente de ambos tóxico por separado, en este trabajo se observa que el tabaco y el alcohol ejercen un efecto sinérgico sobre la producción de proteínas de matriz extracelular. Este resultado corrobora estudios epidemiológicos donde se ha observado que un alto porcentaje de alcohólicos (80-95%) son también fumadores(242) y que el consumo combinado de alcohol y tabaco puede conducir de forma sinérgica a un incremento de riesgo de cáncer pancreático o hepático(243). En un estudio preliminar en ratas Wistar, se muestra que el alcohol o la combinación de ambos tóxicos, más que el tabaco sólo, produce un incremento en la proliferación celular en hígado y páncreas que va a tener como consecuencia un efecto perjudicial sobre la función de ambos tejidos(244). Además, otros estudios previos han demostrado que el consumo de tabaco incrementa el consumo de alcohol tanto en animales como en humanos(242). Concretamente Rose y colaboradores demuestran que el etanol puede aumentar los efectos adictivos del tabaco, entre ellos la satisfacción de fumar, los efectos calmantes y estimulantes y el alivio de ansia por fumar y, por otra parte, puede incluso compensar los efectos de un antagonista nicotínico(245). Por otro lado, en otro estudio en animales de experimentación realizado en ratas alimentadas con etanol, se mostró que la nicotina induce esteatosis hepática y estimula el incremento de depósitos de colágeno; sin embargo, la nicotina no tenía efecto alguno sobre la inflamación inducida por alcohol(236). Este estudio además incidió en el hecho de que el tabaco o su combinación con alcohol, puede iniciar el proceso de fibrogénesis en ausencia de inflamación, ya que son capaces de ejercer su acción sobre la transdiferenciación directamente desde su etapa quiescente. Bajo este contexto, los resultados presentes junto con otros estudios

epidemiológicos previos corroboran la existencia de una potente interacción entre el consumo de alcohol y de tabaco.

Los mecanismos por los que estos dos tóxicos están interaccionando son desconocidos y difíciles de estudiar ya que el metabolismo de ambos tóxicos es diferente en cada individuo y depende del sexo, edad, factores genéticos, así como posibles polimorfismos que modifiquen la actividad de las enzimas implicadas tanto en el metabolismo del alcohol como del tabaco(225). Se sabe que en el metabolismo tanto del alcohol como de la nicotina intervienen las mismas enzimas, la enzima alcohol oxidasa e isoformas del citocromo P-450 (CYP2E1 y CYP2B1)(246). De hecho se ha demostrado que en el hígado, la nicotina induce la expresión de CYP2E1(247). Cabe destacar que cuando los receptores nicotínicos están bloqueados los individuos consumen menos nicotina y también menos alcohol(248,249). Teniendo en cuenta que las PSC expresan la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y que las células acinares pancreáticas poseen actividad tanto de ADH como de CYP450, la interacción de ambas enzimas podría ser la base de los mecanismos de interacción entre ambos tóxicos.

#### *Estudio de proliferación y migración celular en cultivo de PSCs*

Durante el proceso de fibrogénesis se incrementa el número de PSC en el área donde se está produciendo el daño. Este aumento en el número de células es producido tanto por el incremento del ratio de proliferación como por la migración de las células provenientes de otros lugares de la glándula(80). Antes de la identificación de las PSCs como las principales efectoras de la fibrosis pancreática, Elsässer y colaboradores demostraron que existe proliferación de miofibroblastos del páncreas (posteriormente identificadas comoPSCs) después de la inducción de una pancreatitis aguda por ceruleína(250). En cambio, la descripción de la migración de las PSC fue posterior(106). La migración celular es un proceso imprescindible durante procesos de reparación del tejido (106), respuesta inflamatoria(251) e incluso metástasis(252), donde están implicados cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina-miosina(112).

Las PSCs activadas tienen la capacidad de proliferar y migrar en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias y estrés celular. Durante el proceso de reparación del tejido el factor de crecimiento PDGF es secretado por varias células, incluidas las PSC (87)y se ha comprobado que es un potente mediador mitogénico y

quimiotáctico para las PSC a través de las rutas de señalización ERK1/2 y PI3 quinasa(87,106,118,153).

En estado quiescente, las células estrelladas muestran una capacidad de migración y de proliferación limitada comparada con las células en estado activo, por lo tanto el fenotipo activado es un prerrequisito para que las PSCs lleven a cabo estos procesos. Por otra parte, es necesaria la degradación de componentes de la membrana basal (colágeno IV) antes de la migración (106) que se lleva a cabo por MMP-2 secretadas por PSCs activadas. Por ello fue necesario realizar los ensayos en un cultivo de PSC con fenotipo activado.

En nuestro estudio ni el alcohol ni el tabaco de forma independiente estimulan la migración o proliferación de las PSC activadas. La proliferación se examinó mediante dos métodos complementarios, siendo además el WST-1 indicado tanto para el estudio de la proliferación como para la citotoxicidad celular(218). Hasta la fecha numerosos estudios muestran que el etanol por sí sólo no produce un incremento en el ratio de proliferación de las PSCs(82,83)de forma directa.Sin embargo, otros grupos demuestran que el etanol podría estimular este proceso de forma indirecta a través de la activación del sistema NADPH oxidasa tras estímulo con PDGF (123), o por el efecto que ejerce el etanol en la células acinares en presencia de ácidos grasos como VLDL (253). Por otra parte, en una línea celular de células estrelladas hepáticas, el etanol a la misma dosis que en nuestro estudio estimula la migración y la proliferación de las PSCs tras 24 horas de incubación en cultivo; sin embargo, la diferencia en los resultados puede ser debida a las variaciones en las rutas de señalización implicadas en la proliferación y migración de las células estrelladas hepáticas durante fibrosis.

Con respecto al tabaco, aunque existen algunos estudios en otros tipos celulares que analizan el efecto del tabaco utilizando extracto líquido (CSC), la mayoría se centran en el papel de componentes del tabaco por separado. En un estudio realizado en células escamosas de carcinoma oral, se observó que no había incremento en la proliferación utilizando tabaco (CSC) a las mismas dosis estudiadas que en el presente trabajo(218). Por otro lado, en el trabajo de Soeda y colaboradores muestran que dosis de 1nM y 10µM de nicotina estimula la proliferación de las HSC(202).Sin embargo, las dosis correspondientes con ese rango de nicotina en los resultados presentados producen una disminución del ratio de la proliferación que está asociado al efecto tóxico del tabaco debido a la que el páncreas exocrino es muy sensible a la toxicidad de la nicotina(229).

A diferencia de los resultados obtenidos con ambos tóxicos por separado, el tratamiento con la combinación de alcohol y tabaco tras 48 horas de incubación estimuló la capacidad de migración de las PSC en comparación con el tratamiento control. Además, se observó que existe una tendencia a la sinergia entre ambos tóxicos. Sin embargo, no se ha encontrado ningún efecto en la proliferación. El hecho de que se encontrara este efecto tras 48 es coherente con el tiempo necesario para la activación que describimos a las 24 horas.

En relación a los resultados del ensayo de migración, existen dos potenciales factores de confusión. Por un lado el ratio de proliferación, que aunque no existen diferencias entre los distintos tratamientos, puede ejercer un efecto en el ensayo de cicatrización (WHA: *wound healing assay*), ya que las células están confluentes y se abre un espacio (“herida”) donde las células van a migrar permitiendo a las células proliferar. Por otro lado, la gravedad puede actuar favoreciendo el paso de las PSC a través de la membrana en el ensayo de *transwell migration assay* (TMA). Con el fin de eliminar posibles sesgos producidos por ambos factores de confusión, se utilizaron los dos métodos para analizar la capacidad migratoria de las PSC. Utilizando el ensayo WHA eliminamos el posible efecto de la gravedad, ya que las células migran en el mismo plano; mientras que con el ensayo de TMA se elimina el posible efecto de la proliferación al no estar las células confluentes en el inserto. En ambos ensayos la combinación de alcohol y tabaco incrementa de manera significativa el ratio de migración de las PSCs. Además, en el WHA se observó un efecto sinérgico entre los dos tóxicos en comparación con cada uno de ellos por separado, siendo sólo una tendencia a la sinergia en el ensayo de TMA.

Mientras que la capacidad de migración en respuesta a tóxicos se ve incrementada en las PSC, existiendo una tendencia a la sinergia entre ambos, no se ha encontrado un efecto proliferativo directo. Teniendo en cuenta que durante el proceso de la patología pancreática están presentes numerosas citoquinas y factores de crecimiento secretadas por otros tipos celulares, como las células acinares pancreáticas(81), en el proceso de proliferación de las PSC pueden estar interaccionando ambos tipos celulares. Para profundizar en los mecanismos de interacción entre células estrelladas y acinares pancreáticas será necesario realizar más estudios como por ejemplo ensayos de co-cultivo.

### *Estudio de producción de fractalquina*

Las quimioquinas, además de estar implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias dando lugar a una inflamación crónica en el contexto de la pancreatitis, juegan un papel fundamental en la fibrogénesis pancreática, ya que están implicadas en la activación tanto autocrina como paracrina de las PSCs(143). En los últimos años la quimioquina fractalquina (FKN) ha sido centro de atención como posible diana para el tratamiento de enfermedades inflamatorias(254). Se ha observado que los niveles de fractalquina se encuentran incrementados en suero de pacientes con PC y que la determinación estos niveles puede ser útil para valorar el estadio de la PC(145). Bajo este contexto, se ha sugerido que a pesar de que la secreción de muchas quimioquinas puede estar promovida por varios factores inflamatorios e infecciosos, sólo la secreción de fractalquina parece estar promovida sinérgicamente por el etanol(144).

En el presente estudio se observó que el tratamiento con alcohol (50mM) y tabaco estimula la secreción de FKN tras 48 horas de incubación, pero ninguno de los tóxicos por separado induce dicha secreción. De manera similar a lo descrito en el ensayo de migración, no se vio secreción de FKN tras 24 horas probablemente debido a que es el tiempo mínimo necesario para la activación de las PSCs. Uchida y colaboradores han propuesto que la quimioquina fractalquina provoca la progresión de la PC mediante la estimulación del reclutamiento de células inflamatorias como los leucocitos o monocitos(144). Por otro lado, este mismo grupo muestra que el etanol y sus metabolitos tienen un efecto sinérgico con mediadores moleculares asociados a patógenos (por ejemplo LPS) en la modulación de la secreción de FKN y que esto está asociado con el incremento de FKN en suero de pacientes con PC de origen alcohólico(144).

Varias evidencias muestran que la fractalquina no sólo promueve la progresión de la PC sino que también estimula la proliferación celular de células de músculo liso y células del endotelio vascular(255,256,257). Teniendo en cuenta que el etanol inhibe la apoptosis de las PSC (181) y que la fractalquina tiene también efectos antiapoptóticos en células de músculo liso en arterias coronarias(257), los resultados del presente trabajo sugieren que el tabaco y el alcohol perpetuarían el fenotipo activado de las PSC por inhibición de la apoptosis de las PSC y por estimulación de la infiltración de células inflamatorias inducido por la fractalquina.

### *Estudio de producción de ROS en cultivo de PSC*

Como se muestra en los resultados, tanto el tabaco sólo o en combinación con alcohol son capaces de activar las PSC y estimular la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Un factor fundamental en estos procesos es la generación de estrés oxidativo, muy implicado en la patogénesis de la pancreatitis crónica y aguda. En esta línea, estudios previos han sugerido que pro-oxidantes tales como  $H_2O_2$  u  $O_2^-$  participan en la activación y en la producción de colágeno I en las PSCs. Por otra parte, se ha descrito la presencia de especies reactivas del oxígeno tras el daño pancreático generadas por el sistema NADPH oxidasa; de hecho, se observó que la inhibición de este sistema con antioxidantes previene la fibrogénesis en un modelo *in vivo*(124).

Se ha descrito que tanto el alcohol como el acetaldehído producen estrés oxidativo dentro de las PSC en cultivo y que en presencia de vitamina E (antioxidante) se previene la activación producida por el alcohol(123,82). Además, se vio que el efecto que ejerce el etanol sobre las PSCs en cuanto a activación y producción de proteínas de matriz, está mediada en parte por la generación de estrés oxidativo dentro de las células(82). Como en estudios previos, nuestros resultados muestran que el etanol estimula la producción de ROS intracelular en las PSC.

Con respecto al tabaco, se ha demostrado que la nicotina induce estrés oxidativo en un gran número de tipos celulares, entre ellos macrófagos, células hepáticas y células mesangiales. En el hígado la peroxidación lipídica asociada al consumo de tóxicos como el alcohol juega un papel fundamental(208). Por otra parte, se ha estudiado que la nicotina agrava la peroxidación lipídica en ratas con una dieta alta en grasa(258). A diferencia de estudios en otros tipos celulares, en el presente trabajo no se observó que el tabaco por sí sólo estimule la producción de ROS en las PSCs; esto puede estar relacionado con el tiempo de incubación, ya que los estudios realizados hasta la fecha son estudios *in vivo* con un tiempo de incubación de hasta 6 semanas y media de exposición(259). Concretamente, Husain y colaboradores demostraron que en pulmón y en hígado, la nicotina por si sola o en combinación con etanol disminuye la actividad del antioxidante glutatión peroxidasa, y que la combinación de ambos tóxicos incrementa la peroxidación lipídica(259). Por otra parte, Helen y colaboradores sugieren que esta depleción de los sistemas antioxidantes ocurre debido a los altos niveles de ROS producidos por la nicotina(260). En el presente estudio se muestra que la combinación de

tabaco y alcohol estimula la producción de ROS en PSCs sin encontrar un efecto sinérgico entre ambos tóxicos; por tanto, la generación de ROS producida por el tratamiento de combinación de ambos tóxicos es debido al efecto producido por el alcohol *per se* y no por el tabaco.

Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo se ha observado en ausencia de inflamación, no se puede considerar un evento secundario al efecto producido por los dos tóxicos sobre las PSC. De hecho, en nuestro estudio se producen especies reactivas del oxígeno tras un periodo de sólo 3 horas de exposición a los tóxicos. Debido a que por otro lado, el estrés celular está asociado a la generación de radicales libres durante el metabolismo de ambos tóxicos, y que como ya hemos dicho las células acinares poseen la maquinaria necesaria para su metabolismo, cabe pensar que ambas células están interaccionando en la producción de estrés oxidativo en el páncreas tras un consumo prolongado de alcohol y tabaco.

### *Implicaciones Clínicas*

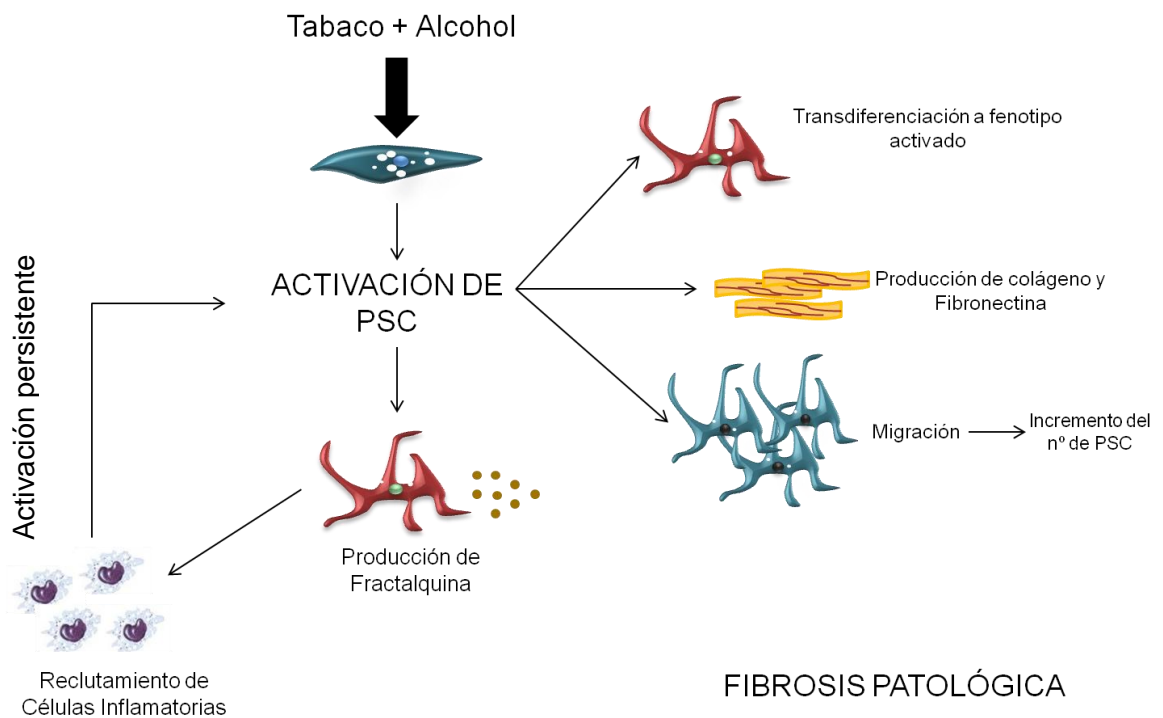
Son varias las cuestiones clínicas que pueden ser explicadas sobre la base de, entre otros, el presente trabajo de investigación. Por un lado, los resultados mostrados aportan luz a la discusión del posible desarrollo de fibrosis pancreática fuera del contexto de una pancreatitis crónica, lo cual tiene un importante impacto en el diagnóstico por imagen de esta enfermedad. Por otro, el papel etiopatogénico del tabaco en pancreatitis crónica apoya todas las medidas de prevención a través de la reducción del consumo de este tóxico, así como aquellas destinadas a prevenir la progresión de la enfermedad una vez desarrollada.

Nuestro trabajo muestra que las células estrelladas pancreáticas se activan en respuesta a tabaco sólo o combinado con alcohol, lo que conlleva un cambio de fenotipo, producción de proteínas de matriz extracelular, migración y secreción de fractalquina. En el caso de la producción de proteínas extracelulares los efectos producidos por ambos tóxicos combinados son sinérgicos.

Analizando los resultados obtenidos en el presente estudio podemos proponer una vía por la que el alcohol y el tabaco interaccionan en el desarrollo de fibrosis pancreática. El hecho de que cualquiera de los dos tóxicos por separado o su combinación estimulen la

transdiferenciación de las PSCs directamente desde su etapa quiescente aporta un dato más de la existencia de una ruta independiente al proceso inflamatorio en el desarrollo de fibrosis pancreática *in vivo*. Este hecho podría sugerir el desarrollo de fibrosis pancreática en ausencia de pancreatitis crónica, lo cual tiene importantes implicaciones clínicas. De hecho, el diagnóstico de pancreatitis crónica en la práctica clínica se basa en la demostración de alteraciones morfológicas y, de forma menos frecuente, funcionales que son consecuencia no del proceso inflamatorio sino del de fibrogénesis. Las alteraciones pancreáticas objetivadas en técnicas como la tomografía axial computerizada, la resonancia magnética o la ecografía endoscópica durante el proceso diagnóstico de la pancreatitis crónica son consecuencia de la fibrosis de la glándula, lo cual podría no ser siempre indicativo de la existencia de esta enfermedad.

Sin embargo, alcohol y tabaco combinados estimulan la secreción de moléculas proinflamatorias como la fractalquina, lo cual se asocia al reclutamiento de macrófagos y otras células inflamatorias. El reclutamiento de células inflamatorias sería un proceso secundario a la activación de las PSC que perpetuarían el fenotipo activado de las mismas y por otro lado, se produciría un infiltrado inflamatorio en el tejido que conllevaría el cuadro histopatológico de pancreatitis crónica (Figura 58). Por tanto, en este contexto de consumo de alcohol y tabaco como factores etiológicos, muy probablemente no sea factible el desarrollo de fibrosis pancreática sin proceso inflamatorio asociado, que es lo que define la existencia de pancreatitis crónica. Además, la infiltración de moléculas inflamatorias unido a la producción de especies reactivas del oxígeno estimulado por ambos tóxicos, probablemente se asocie a destrucción del parénquima funcionante y por lo tanto al desarrollo a largo plazo de insuficiencia pancreática endocrina y exocrina. Por último, el desarrollo de fibrosis pancreática por cualquier otra causa distinta de alcohol y tabaco sin que se produzca una respuesta inflamatoria paralela es poco probable, debido a la producción de moléculas proinflamatorias por las propias células estrelladas activadas, con lo que el debate de la existencia o no de fibrosis pancreática sin pancreatitis crónica tendría poco sentido. Hay que tener además en cuenta que cualquier factor capaz de activar directamente las células estrelladas pancreáticas va a actuar igualmente sobre las células acinares (algo que ha sido descrito previamente por nuestro grupo en relación al alcohol y el tabaco), haciendo aún más improbable la fibrogénesis sin proceso inflamatorio asociado.



**Figura 58. Esquema del modelo propuesto del papel del tabaco en combinación con el alcohol en los procesos asociados a fibrosis pancreática.**

Por todo lo expuesto, aunque el consumo de alcohol se asocia a la fibrosis pancreática, ambos tóxicos ejercen una potente interacción sobre la activación temprana de las PSC en ausencia de cualquier otro factor; y además un consumo continuado y prolongado de ambos tóxicos estimularía el infiltrado inflamatorio posterior que conllevaría el desarrollo de fibrosis y la pérdida de función del tejido. Hay que tener además en cuenta la existencia de interacciones entre las PSC con otros tipos celulares pancreáticos, como las células acinares en el desarrollo de este proceso. Por lo tanto estudios posteriores en esta línea son necesarios para evaluar la interacción entre células acinares y estrelladas y dilucidar en que etapa del desarrollo de la enfermedad el desarrollo de fibrosis es o no reversible.

La siguiente área clínica donde los resultados del presente trabajo tienen un claro impacto es la relacionada con la prevención y tratamiento de la pancreatitis crónica. Es obvio que siendo el tabaco un factor claramente involucrado en el desarrollo de esta

enfermedad, cualquier campaña dirigida a la reducción de su consumo va a tener impacto en su incidencia y prevalencia. Por otra parte, estudio clínicos previos experimentales tanto con alcohol(181) como con tabaco(261), han demostrado que la abstinencia de ambos tóxicos, y de forma especialmente importante del tabaco, se asocia a una menor progresión de la pancreatitis crónica ya establecida. Por tanto, la recomendación de la estricta abstinencia no solo de alcohol sino de tabaco es una de las medidas terapéuticas fundamentales en los pacientes con pancreatitis crónica.



## ***7. Conclusiones***



# Conclusiones

---

1. Concentraciones altas de tabaco son tóxicas para las células estrelladas pancreáticas, lo que pone de manifiesto la sensibilidad del páncreas exocrino a la toxicidad del tabaco. La adición de alcohol no modifica el efecto tóxico del tabaco sobre las células estrelladas pancreáticas.
2. Ni el tabaco ni el alcohol solos o en combinación estimulan la proliferación de las células estrelladas pancreáticas de forma directa. Deben existir otros factores implicados en la inducción de la proliferación de las mismas.
3. El tabaco sólo o en combinación con alcohol a dosis clínicamente relevantes estimula, de forma directa, la transdiferenciación de las células estrelladas desde su estado quiescente a un estado activado en ausencia de otros activadores como el proceso inflamatorio.
4. El tabaco en combinación con alcohol, pero ninguno de los dos tóxicos por separado, estimula la capacidad de migración de las células estrelladas pancreáticas favoreciendo su reclutamiento durante el daño pancreático y por tanto favoreciendo el desarrollo de fibrosis.
5. El tabaco en combinación con alcohol estimula la expresión de proteínas de matriz extracelular favoreciendo la acumulación de matriz en el tejido y por tanto el desarrollo de fibrosis.
6. El tabaco en combinación con alcohol tiene un efecto sinérgico en la producción de proteínas de matriz demostrando que existe una potente interacción entre ambos tóxicos en el desarrollo de fibrosis pancreática.
7. El tabaco en combinación con alcohol estimula la secreción de fractalquina estimulando el reclutamiento de células inflamatorias y por tanto la respuesta inflamatoria asociado a daño pancreático.
8. El alcohol de forma independiente o combinado con tabaco, pero no el tabaco sólo, estimula la producción de especies reactivas del oxígeno en las células estrelladas pancreáticas y media en parte la activación de las PSC.



## *8. Líneas futuras de trabajo*



# Líneas futuras de trabajo

---

Los resultados obtenidos en el presente estudio abren la puerta a un gran número de líneas de investigación centradas en el conocimiento de la etiopatogenia de la pancreatitis crónica y en profundizar en el papel que tiene el consumo de tóxicos en la evolución de la enfermedad. Actualmente no existe ningún tratamiento que permita frenar la progresión de la pancreatitis crónica, la regresión del proceso inflamatorio, de fibrosis o su curación. Por ello, en la actualidad se está llevando a cabo el diseño de un proyecto para la determinación de la interacción entre las células estrelladas y las células acinares pancreáticas, ya que está demostrado que estos dos tipos celulares actúan conjuntamente durante daño pancreático. El fin último sería determinar posibles dianas de actuación y definir con más exactitud la fisiopatología de la PC estableciendo así potenciales dianas terapéuticas. En segundo lugar, sería importante definir el papel de los tóxicos durante daño pancreático *in vivo* con animales de experimentación. Por otra parte, además de la línea de investigación en animales de experimentación, se está desarrollando de forma paralela un proyecto cuyo objetivo es el análisis de las moléculas que intervienen en el proceso inflamatorio en suero de pacientes diagnosticados con pancreatitis crónica y ver su asociación con la etiología tabáquica.

En este sentido, se considera sumamente importante la continuación de dicha línea de investigación con el fin de mejorar el manejo y tratamiento de pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica en la rutina clínica.



## *9. Bibliografía*



# Bibliografía

---

1. Braganza J, Lee S, McCloy R, McMahon M. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2011; 377: p. 1184-97.
2. Kamisawa T, Okamoto A. Prognosis of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2007; 42: p. 59-62.
3. Talamini G, Bassi C, Butturini G, Falconi M, Casetti L, Gumbs A, et al. Outcome and quality of life in chronic pancreatitis. *JOP. J Pancreas (Online)*. 2001; 2: p. 117-23.
4. Omary M, Lugea A, Lowe A, Pandol S. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007; 117: p. 50-59.
5. Howard J, Hess W. The Early Surgeon-Anatomists. In Howard J, Hess W. *History of the Pancreas: The Mysteries of a Hidden Organ*. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 1-64.
6. Busnardo A, Didio L, Tidrick R, Thomford N. History of the Pancreas. *Am J Surg*. 1983; 146: p. 539-550.
7. Jolles S. Paul Langerhans. *J Clin Pathol*. 2002; 55(243).
8. Apte M, Pirola R, Wilson J. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25: p. 1816-1826.
9. Reginald HF. Acute Pancreatitis — A Consideration of Pancreatic Hemorrhage, Hemorrhagic, Suppurative, and Gangrenous Pancreatitis, and of Disseminated Fat-Necrosis. *Boston Med Surg J (NEJM)*. 1889; 120: p. 181-187.
10. McClusky DA, SLCG. Harbinger or Hermit? Pancreatic Anatomy and Surgery through the Ages—Part 1. *World J. Surg*. 2002; 26: p. 1175–1185.
11. Etemad B, Whitcomb D. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001; 120: p. 682-707.
12. Pitchumoni C. Chronic pancreatitis: a historical and clinical sketch of the pancreas and pancreatitis. *Gastroenterologist*. 1998; 6: p. 24-33.
13. Whitcomb D, Gorry M, Preston R, Furey W, Sossenheimer M, Ulrich C, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996; 14: p. 141-145.

14. Friedman S. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008; 88: p. 125-172.
15. Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1982; 58: p. 837-858.
16. Saotome T, Inoue H, Fujimiya M, Bamba T. Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas.* 1997; 14: p. 373-382.
17. Apte M, Haber P, Applegate T, Norton I, McCaughan G, Korsten M, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* 1998; 43: p. 128-133.
18. Bachem M, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid R, Menke A, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 1998; 115: p. 421-432.
19. Erkan M, Weis N, Pan Z, Schwager C, Samkharadze T, Jiang X, et al. Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Mol Cancer.* 2010; 9: p. 88-103.
20. Yadav D, Timmons L, Benson J, Dierkhising R, Chari S. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106: p. 2192-2199.
21. Hirota M, Shimosegawa T, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Hamada S, et al. The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *Pancreatology.* 2012; 12: p. 79-84.
22. Witt H, Apte M, Keim V, Wilson J. Chronic Pancreatitis: Challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology.* 2007; 132: p. 1557-1573.
23. Lowenfels A, Maisonneuve P. Risk factors for pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 2005; 95: p. 649-56.
24. Yadav D, Hawes R, Brand R, Anderson M, Money M, Banks P, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med.* 2009; 169: p. 1035-45.
25. Lankisch P, Lowenfels A, Maisonneuve P. What is the risk of alcoholic pancreatitis in heavy drinkers? *Pancreas.* 2002; 25: p. 411-412.
26. Dufour M, Adamson M. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas.*

- 2003; 27: p. 286-290.
27. Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Rigo L, et al. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*. 1999; 44: p. 1303-1311.
  28. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. Research Committee on Intractable Pancreatic Diseases. *Pancreas*. 2000; 21: p. 109-114.
  29. Maisonneuve P, Lowenfels A, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch P, Andersen J, et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*. 2005; 54: p. 510-514.
  30. Mithöfer K, Fernández-del Castillo C, Frick T, Lewandrowski K, Rattner D, Warshaw A. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology*. 1995; 109: p. 239-246.
  31. Bess M, Edis A, van Heerden J. Hyperparathyroidism and pancreatitis. Chance or a causal association? *JAMA*. 1980; 243: p. 246-247.
  32. Mergener K, Baillie J. Chronic Pancreatitis. *Lancet*. 1997; 350: p. 1379-1385.
  33. Witt H, Bhatia E. Genetic aspects of tropical calcific pancreatitis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008; 9: p. 213-226.
  34. Sandhu B, Vitazka P, Ferreira-Gonzalez A, Pandya A, Vachhani R, Bouhaidar D, et al. Presence of SPINK-1 variant alters the course of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26: p. 965-969.
  35. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med*. 1998; 339: p. 645-652.
  36. Rabassa A, Schwartz M, Ertan A. Alpha 1-antitrypsin deficiency and chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 1995; 40: p. 1997-2001.
  37. Sah R, Chari S, Pannala R, Sugumar A, Clain J, Levy M, et al. Differences in clinical profile and relapse rate of type 1 versus type 2 autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010; 139: p. 140-148.
  38. Ketikoglou I, Moulakakis A. Autoimmune pancreatitis. *Dig Liver Dis*. 2005; 37: p. 211-215.
  39. Whitcomb D. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut*. 1999; 45: p. 317-322.

40. Di Sebastiano P, di Mola F, Buchler M, Friess H. Pathogenesis of pain in chronic pancreatitis. *Dig Dis*. 2004; 22: p. 267-272.
41. Castiñeira-Alvariño M, Lindkvist B, Luaces-Regueira M, Iglesias-García J, Lariño-Noia J, Nieto-García L, et al. The role of high fat diet in the development of complications of chronic pancreatitis. *Clin Nutr*. 2013; 32: p. 830-836.
42. Rodbard H, Blonde L, Braithwaite S, Brett E, Cobin R, Handelsman Y, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the management of diabetes mellitus. *Endocr Pract*. 2007; 13 Suppl 1: p. 1-68.
43. DiMagno E, Go V, Summerskill W. Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N Engl J Med*. 1973; 288: p. 813-815.
44. Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain J, Bakken L, DiMagno E. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1994; 107: p. 1481-1487.
45. Heider T, Azeem S, Galanko J, Behrns K. The natural history of pancreatitis-induced splenic vein thrombosis. *Ann Surg*. 2004; 239: p. 876 – 882.
46. Bradley E3. The natural history of splenic vein thrombosis due to chronic pancreatitis: indications for surgery. *Int J Pancreatol*. 1987; 2: p. 87-92.
47. Vjungco J, Prinz R. Management of Biliary and Duodenal Complications of Chronic Pancreatitis. *World J. Surg*. 2003; 27: p. 1258–1270.
48. Sánchez-Bernal C, San Román García J, López Rodríguez M, Calvo Andrés J. Fisiología y bioquímica del páncreas. In Navarro S, Perez-Mateo M, Guarner L. *Tratado de páncreas exocrino*. Barcelona: J&C Ediciones Médicas; 2002. p. 11-34.
49. Klonowski-Stumpe H, Lüthen R, Han B, Sata N, Häussinger D, Niederau C. Inhibition of cathepsin B does not affect the intracellular activation of trypsinogen by cerulein hyperstimulation in isolated rat pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 1998; 16: p. 96-101.
50. Yamaguchi H, Kimura T, Mimura K, Nawata H. Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas*. 1989; 4: p. 565-571.
51. Halangk W, Lerch M, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 2000; 106: p. 773-781.
52. Gorelick F, Modlin I, Leach S, Carangelo R, Katz M. Intracellular proteolysis of

- pancreatic zymogens. *Yale J Biol Med.* 1992; 65: p. 407-420.
53. Low J, Shukla A, Thorn P. Pancreatic acinar cell: new insights into the control of secretion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: p. 1586-1589.
54. Gorelick F, Thrower E. The acinar cell and early pancreatitis responses. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009; 7(11 suppl): p. S10–4.
55. Criddle D, Murphy J, Fisetto G, Barrow S, Tepikin A, Neoptolemos J, et al. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology.* 2006; 130: p. 781-93.
56. Petersen O, Sutton R. Ca<sup>2+</sup> signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: p. 113-120.
57. Yu J, Kim H, Kim K. Calcium-dependent apoptotic gene expression in cerulein-treated AR42J cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1010: p. 66-69.
58. Williams J. Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010; 26: p. 478-483.
59. Thomas P, Bagrij T, Campos-Toimil M, Edwardson J. Mitochondria play a critical role in shaping the exocytotic response of rat pancreatic acinar cells. *Cell Calcium.* 2006; 39: p. 57-63.
60. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 1999; 11: p. 1-14.
61. Haddad J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 2002; 14: p. 879-897.
62. Rosado J, González A, Salido G, Pariente J. Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal.* 2002; 14: p. 547-556.
63. Gukovsky I, Gukovskaya A, Blinman T, Zaninovic V, Pandol S. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol.* 1998; 275: p. 1402-1414.
64. Fu K, Sarras MJ, De Lisle R, Andrews G. Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol.* 1997; 273: p. 696-705.
65. Gukovskaya A, Perkins P, Zaninovic V, Sandoval D, Rutherford R, Fitzsimmons T, et al. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology.* 1996; 110: p. 875-884.

66. Gukovskaya A, Pandol S. Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2004; 4: p. 567-586.
67. Gurtner G, Werner S, Barrandon Y, Longaker M. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453: p. 314-321.
68. Yurchenco P, Patton B. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des*. 2009; 15: p. 1277-1294.
69. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 19. Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. In Dilek MSAaB, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. p. 1090-1113.
70. Kennedy R, Bockman D, Uscanga L, Choux R, Grimaud J, Sarles H. Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1986; 2: p. 61-72.
71. Riopel M, Li J, Liu S, Leask A, Wang R.  $\beta$ 1 integrin-extracellular matrix interactions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function. *Lab Invest*. 2013; 93: p. 31-40.
72. Cascales Angosto M, Alvarez-Gomez J. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm*. 2010; 76: p. 59-84.
73. Johnson L, Dyer R, Hupe D. Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol*. 1998; 2: p. 466-471.
74. Schwarzbauer J, Tamkun J, Lemischka I, Hynes R. Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell*. 1983; 35: p. 421-431.
75. Schwarzbauer J, Patel R, Fonda D, Hynes R. Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J*. 1987; 6: p. 2573-2580.
76. Borsi L, Balza E, Leprini A, Ponassi M, Zardi L. Procedure for the purification of the fibronectin proteolytic fragments containing the ED-B oncofetal domain. Procedure for the purification of the fibronectin proteolytic fragments containing the ED-B oncofetal domain. *Anal Biochem*. 1991; 192: p. 372-9.
77. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, et al. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest*. 2000; 80: p. 47-55.
78. Saurer L, Reber P, Schaffner T, Büchler M, Buri C, Kappeler A, et al. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis.

- Gastroenterology. 2000; 118: p. 356-367.
79. Apte M, Wilson J. Mechanisms of pancreatic fibrosis. *Dig Dis*. 2004; 22: p. 273-279.
  80. Haber P, Keogh G, Apte M, Moran C, Stewart N, Crawford D, et al. Activation of Pancreatic Stellate Cells in Human and Experimental Pancreatic Fibrosis. *Am J Pathol*. 1999; 155: p. 1087–1095.
  81. Bachem M, Zhou Z, Zhou S, Siech M. Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: p. 92-96.
  82. Apte M, Phillips P, Fahmy R, Darby S, Rodgers S, McCaughan G, et al. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000; 118: p. 780-794.
  83. Masamune A, Satoh A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, et al. Effects of ethanol and its metabolites on human pancreatic stellate cells. *Dig Dis Sci*. 2010; 55: p. 204-211.
  84. Yokota T, Denham W, Murayama K, Pelham C, Joehl R, Bell RJ. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *J Surg Res*. 2002; 104: p. 106-111.
  85. Klöppel G. Progression from acute to chronic pancreatitis. A pathologist's view. *Surg Clin North*. 1999; 79: p. 801–814.
  86. Klöppel G, Maillet B. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992; 420: p. 1-4.
  87. Apte M, Haber P, Darby S, Rodgers S, McCaughan G, Korsten M, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*. 1999; 44: p. 534-541.
  88. Suda K, Mogaki M, Oyama T, Matsumoto Y. Histopathologic and immunohistochemical studies on alcoholic pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis: special emphasis on ductal obstruction and genesis of pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 1990; 85: p. 271-276.
  89. Klöppel G. Morphology of acute pancreatitis in relation to etiology and pathogenesis. In Malfertheiner P, Domínguez-Muñoz J, Schulz H, Lippert H, editors. *Diagnostic Procedures in Pancreatic Disease*.: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 13-20.
  90. Suda K. Pathogenesis and progression of human pancreatic fibrosis. *Med Electron Microsc*. 2000; 33: p. 200-206.

91. Asahina K, Tsai S, Li P, Ishii M, Maxson RJ, Sucov H, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 2009; 49: p. 998-1011.
92. Kiassov A, Van Eyken P, van Pelt J, Depla E, Fevery J, Desmet V, et al. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation*. 1995; 59: p. 253-258.
93. Niki T, Pekny M, Hellems K, Bleser P, Berg K, Vaeyens F, et al. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999; 29: p. 520-527.
94. Buchholz M, Kestler H, Holzmann K, Ellenrieder V, Schneiderhan W, Siech M, et al. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med (Berl)*. 2005; 83: p. 795-805.
95. Sparmann G, Kruse M, Hofmeister-Mielke N, Koczan D, Jaster R, Liebe S, et al. Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats. *Cell Res*. 2010; 20: p. 288-298.
96. Casini A, Galli A, Pignalosa P, Frulloni L, Grappone C, Milani S, et al. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol*. 2000; 192: p. 81-89.
97. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2002; 277: p. 141-147.
98. Puig-Diví V, Molero X, Salas A, Guarner F, Guarner L, Malagelada J. Induction of chronic pancreatic disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatic ducts. *Pancreas*. 1996; 13: p. 417-424.
99. Neuschwander-Tetri B, Burton F, Presti M, Britton R, Janney C, Garvin P, et al. Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse. *Dig Dis Sci*. 2000; 45: p. 665-674.
100. Neuschwander-Tetri B, Bridle K, Wells L, Marcu M, Ramm G. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. *Lab Invest*. 2000; 80: p. 143-150.
101. Murayama K, Barent B, Gruber M, Brooks A, Eliason S, Brunt E, et al. Characterization of a novel model of pancreatic fibrosis and acinar atrophy. *J Gastrointest Surg*. 1999; 3: p. 418-425.

102. Aghdassi A, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss F, Sendler M, Lerch M. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011; 4: p. 26.
103. Tsukamoto H, Towner S, Yu G, French S. Potentiation of ethanol-induced pancreatic injury by dietary fat. Induction of chronic pancreatitis by alcohol in rats. *Am J Pathol*. 1988; 131: p. 246-257.
104. Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar R, Pirola R, Wilson J, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology*. 2007; 133: p. 1293-1303.
105. Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002; 50: p. 535-541.
106. Phillips P, Wu M, Kumar R, Doherty E, McCarroll J, Park S, et al. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut*. 2003; 52: p. 677-682.
107. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Hamada S, et al. Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. *Gut*. 2009; 58: p. 550-559.
108. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid R, Menke A, et al. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281: p. 532-543.
109. Zimmermann A, Gloor B, Kappeler A, Uhl W, Friess H, Büchler M. Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut*. 2002; 51: p. 574-578.
110. Yu E, Choe G, Gong G, Lee I. Expression of alpha-smooth muscle actin in liver diseases. *J Korean Med Sci*. 1993; 8: p. 367-373.
111. Kim N, Yoo W, Lee J, Kim H, Lee H, Kim Y, et al. Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin. *Gut*. 2009; 58: p. 1382-1390.
112. Lauffenburger D, Horwitz A. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 1996; 84: p. 359-369.
113. McCarroll J, Phillips P, Santucci N, Pirola R, Wilson J, Apte M. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut*. 2006; 55: p. 79-89.
114. Klonowski-Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Lüthen R, Häussinger D. Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;

283: p. 819-826.

115. Rickmann M, Vaquero E, Malagelada J, Molero X. Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology*. 2007; 132: p. 2518-2532.
116. Fitzner B, Lange A, Müller S, Jaster R. Cdkn1a is a key mediator of rat pancreatic stellate cell senescence. *Pancreatology*. 2013; 13: p. 254-262.
117. Fitzner B, Müller S, Walther M, Fischer M, Engelmann R, Müller-Hilke B, et al. Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med*. 2012; 16: p. 2620-2630.
118. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Kume K, Shomosegawa T. Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *Tohoku J Exp Med*. 2003; 199: p. 69-84.
119. Shinozaki S, Mashima H, Ohnishi H, Sugano K. IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF-kappaB/TGF-beta1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 393: p. 61-65.
120. Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, Yasuda H, Tamada K, Ueda N, et al. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut*. 2003; 52: p. 1487-1493.
121. Aoki H, Ohnishi H, K H, Shinozaki S, Kita H, Yamamoto H, et al. Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem*. 2006; 99: p. 221-228.
122. Kikuta K, Masamune A, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. 4-hydroxy-2, 3-nonenal activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2004; 10: p. 2344-2351.
123. Hu R, Wang Y, Edderkaoui M, Lugea A, Apte M, Pandol S. Ethanol augments PDGF-induced NADPH oxidase activity and proliferation in rat pancreatic stellate cells. *Pancreatology*. 2007; 7: p. 332-340.
124. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Shimosegawa T. NADPH oxidase plays a crucial role in the activation of pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294: p. G99-G108.
125. Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 293: p. 972-978.

126. Jonitz A, Fitzner B, Jaster R. Molecular determinants of the profibrogenic effects of endothelin-1 in pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: p. 4143-4149.
127. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Satoh K, Shimosegawa T. Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: p. 6144-6151.
128. Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Shinozaki S, Kita H, Osawa H, et al. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292: p. 259-268.
129. Masamune A, Satoh M, Hirabayashi J, Kasai K, Satoh K, Shimosegawa T. Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: p. 729-736.
130. Nomiya Y, Tashiro M, Yamaguchi , Watanabe S, Taguchi M, Asaumi H, et al. High glucose activates rat pancreatic stellate cells through protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Pancreas.* 2007; 34: p. 364-372.
131. Yashpal N, Li J, Wheeler M, Wang R. Expression of beta1 integrin receptors during rat pancreas development--sites and dynamics. *Endocrinology.* 2005; 146: p. 1798-1807.
132. Mato E, Lucas M, Petriz J, Gomis R, Novials A. Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem J.* 2009; 421: p. 181-191.
133. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors. *J Gastroenterol.* 2008; 43: p. 352-362.
134. Shimizu K, Hashimoto K, Tahara J, Imaeda H, Andoh A, Shiratori K. Pancreatic stellate cells do not exhibit features of antigen-presenting cells. *Pancreas.* 2012; 41: p. 422-427.
135. Berna M, Seiz O, Nast J, Benten D, Bläker M. CCK1 and CCK2 receptors are expressed on pancreatic stellate cells and induce collagen production. *J Biol Chem.* 2010; 285: p. 38905–38914.
136. Phillips P, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, et al. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: p. 17397-17402.
137. Masamune A, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells--multi-functional cells in the pancreas. *Pancreatology.* 2013; 13: p. 102-105.

138. Demols A, Van Laethem J, Quertinmont E, Degraef C, Delhaye M, Geerts A, et al. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 282: p. 1105-1112.
139. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 295: p. 709-717.
140. Marra F. Renaming cytokines: MCP-1, major chemokine in pancreatitis. *Gut.* 2005; 54: p. 1679-1681.
141. Masamune A, Sakai Y, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. Activated rat pancreatic stellate cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Pancreas.* 2002; 25: p. 78-85.
142. Bazan J, Bacon K, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with CX3C motif. *Nature.* 1997; 385: p. 640-644.
143. Ito T. Can measurement of chemokines become useful biological and functional markers of early-stage chronic pancreatitis? *J Gastroenterol.* 2007; 42: p. 72-77.
144. Uchida M, Ito T, Nakamura T, Igarashi H, Oono T, Fujimori N, et al. ERK pathway and sheddases play an essential role in ethanol-induced CX3CL1 release in pancreatic stellate cells. *Lab Invest.* 2013; 93: p. 41-53.
145. Yasuda M, Ito T, Oono T, Kawabe K, Kaku T, Igarashi H, et al. Fractalkine and TGF-beta1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: p. 6488-6495.
146. Huang L, Chen P, Xu L, Zhou Y, Li W, Yuan Y. Fractalkine as a marker for assessment of severe acute pancreatitis. *J Dig Dis.* 2012; 13: p. 225-231.
147. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001; 410: p. 37-40.
148. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001; 20: p. 2390-2400.
149. Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut.* 2002; 51: p. 579-584.
150. Masamune A, Kikuta K, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. *J pharmacol Exp Ther.* 2003; 304: p. 8-14.

151. Dhanasekaran D, Reddy E. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008; 27: p. 6245-6251.
152. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Shimosewaga T. Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: p. 1292-1302.
153. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: p. 3385-3391.
154. Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, et al. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *J Biol Chem*. 2004; 279: p. 8873-8878.
155. Shinozaki S, Ohnishi H, Hama K, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, et al. Indian hedgehog promotes the migration of rat activated pancreatic stellate cells by increasing membrane type-1 matrix metalloproteinase on the plasma membrane. *J Cell Physiol*. 2008; 216: p. 38-46.
156. Masamune A, Suzuki N, Kikuta K, Ariga H, Hayashi S, Takikawa T, et al. Connexins regulate cell functions in pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2013; 42: p. 308-316.
157. Kikuta K, Masamune A, Hamada S, Takikawa T, Nakano E, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells reduce insulin expression and induce apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 433: p. 292-297.
158. Apte M, Park S, Phillips P, Santucci N, Goldstein D, Kumar R, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2004; 29: p. 179-187.
159. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, et al. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 403: p. 380-384.
160. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: p. 57-70.
161. Apte M, Pirola R, Wilson J. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol*. 2012; 3: p. 344.
162. Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, et al. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 421: p. 349-354.
163. Lonardo E, Frias-Aldeguer J, Hermann P, Heeschen C. Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness. *Cell*

Cycle. 2012; 11: p. 1282-1290.

164. Stevens T, Conwell D, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99: p. 2256-2270.
165. Apte M, Norton I, Haber P, McCaughan G, Korsten M, Pirola R, et al. Both ethanol and protein deficiency increase messenger RNA levels for pancreatic lithostathine. *Life Sci.* 1996; 58: p. 485-492.
166. Apte M, Norton I, Haber P, Korsten M, McCaughan G, Pirola R, et al. Chronic ethanol administration decreases rat pancreatic GP2 content. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1336: p. 89-98.
167. Norton I, Apte M, Haber P, McCaughan G, Pirola R, Wilson J. Cytochrome P450E1 is present in rat pancreas and is induced by chronic ethanol administration. *Gut.* 1998; 42: p. 426-30.
168. Nieto N, Friedman S, Cederbaum A. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology.* 2002; 35: p. 62-73.
169. Dolai S, Liang T, Lam P, Fernandez N, Chidambaram S, Gaisano H. Effects of ethanol metabolites on exocytosis of pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology.* 2012; 143: p. 832-843.
170. Palmieri V, Grattagliano I, Palasciano G. Ethanol induces secretion of oxidized proteins by pancreatic acinar cells. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23: p. 459-464.
171. Wilson J, Apte M. Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis. *Pancreas.* 2003; 27: p. 311-315.
172. Gukovskaya A, Mouria M, Gukovsky I, Reyes C, Kasho V, Faller L, et al. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology.* 2002; 122: p. 106-18.
173. Hungund B, Goldstein D, Villegas F, Cooper T. Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37: p. 3001-3004.
174. Lange L, Sobel B. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest.* 1983; 72: p. 724-731.
175. Fortunato F, Deng X, Gates L, McClain C, Bimmler D, Graf R, et al. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: p. G232-241.

176. Gukovskaya A, Mareninova O, Odinkova I, Sung K, Lugea A, Fischer L, et al. Cell death in pancreatitis: effects of alcohol. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21 Suppl 3: p. S10-3.
177. Wang Y, Hu R, Lugea A, Gukovsky I, Smoot D, Gukovskaya A, et al. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. *Pancreas*. 2006; 32: p. 351-359.
178. Lugea A, Tischler D, Nguyen J, Gong J, Gukovsky I, French S, et al. Adaptive unfolded protein response attenuates alcohol-induced pancreatic damage. *Gastroenterology*. 2011; 140: p. 987-997.
179. Chiang C, Wu C, Lee S, Chung C, Wang C, Lee S, et al. Expression pattern, ethanol-metabolizing activities, and cellular localization of alcohol and aldehyde dehydrogenases in human pancreas: implications for pathogenesis of alcohol-induced pancreatic injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33: p. 1059-1068.
180. Vonlaufen A, Wilson J, Pirola R, Apte M. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health*. 2007; 30: p. 48-54.
181. Vonlaufen A, Phillips P, Xu Z, Zhang X, Yang L, Pirola R, et al. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats. *Gut*. 2011; 60: p. 238-246.
182. Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Nagashio Y, Nomiya Y, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells. *Eur J Clin Invest*. 2006; 36: p. 113-122.
183. Report on Carcinogens, Twelfth Edition. Tobacco related exposures. National Toxicology Program. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services; 2011.
184. Pryor W, Prier D, Church D. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect*. 1983; 47: p. 345-355.
185. Lindstrom J, Schoepfer R, Whiting P. Molecular studies of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor family. *Mol Neurobiol*. 1987; 1: p. 281-337.
186. Momi N, Ponnusamy M, Kaur S, Rachagani S, Kunigal S, Chellappan S, et al. Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through  $\alpha 7nAChR$ -mediated MUC4 upregulation. *Oncogene*. 2013; 32: p. 1384-1395.
187. Wynder E, Hoffmann D. Tobacco and tobacco smoke. *Semin Oncol*. 1976; 3: p. 5-15.
188. Lowenfels A, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer.

Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2006; 20: p. 197-209.

189. Larsson S, Permert J, Håkansson N, Näslund I, Bergkvist L, Wolk A. Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer*. 2005; 93: p. 1310-5.
190. Fuchs C, Colditz G, Stampfer M, Giovannucci E, Hunter D, Rimm E, et al. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med*. 1996; 156: p. 2255-60.
191. Lindkvist B, Appelros S, Manjer J, Berglund G, Borgstrom A. A prospective cohort study of smoking in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2008; 8: p. 63-70.
192. Bourliere M, Barthet M, Berthezene P, Durbec J, Sarles H. Is tobacco a risk factor for chronic pancreatitis and alcoholic cirrhosis? *Gut*. 1991; 32: p. 1392-95.
193. Law R, Parsi M, Lopez R, Zuccaro G, Stevens T. Cigarette smoking is independently associated with chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2010; 10: p. 54-59.
194. Cavallini G, Talamini G, Vaona B, Bovo P, Filippini M, Rigo L, et al. Effect of alcohol and smoking on pancreatic lithogenesis in the course of chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1994; 9: p. 42-46.
195. Wittel U, Pandey K, Andrianifahanana M, Johansson S, Cullen D, Akhter M, et al. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: p. 148-159.
196. Chowdhury P, Hosotani R, Chang L, Rayford P. Metabolic and pathologic effects of nicotine on gastrointestinal tract and pancreas of rats. *Pancreas*. 1990; 5: p. 222-9.
197. Chowdhury P. An exploratory study on the development of an animal model of acute pancreatitis following nicotine exposure. *Tob Induc Dis*. 2003; 1: p. 213-217.
198. Jensen K, Nizamutdinov D, Guerrier M, Afroze S, Dostal D, Glaser S. General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis. *FASEB J*. 2012; 26: p. 4778-4787.
199. Roomans G, Vanthanouvong V, Dragomir A, Kozlova I, Wróblewski R. Effects of nicotine on intestinal and respiratory epithelium. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2002; 34: p. 381-388.
200. Arany I, Grifoni S, Clark J, Csongradi E, Maric C, Juncos L. Chronic nicotine exposure exacerbates acute renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301: p. 125-133.
201. Arany I, Reed D, Grifoni S, Chandrashekar K, Booz G, Juncos L. A novel U-STAT3-

- dependent mechanism mediates the deleterious effects of chronic nicotine exposure on renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; 302: p. 722-729.
202. Soeda J, Morgan M, McKee C, Muralidarane A, Lin C, Roskams T, et al. Nicotine induces fibrogenic changes in human liver via nicotinic acetylcholine receptors expressed on hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 417: p. 17-22.
203. Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, et al. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. *Cardiovasc Res*. 2009; 83: p. 465-472.
204. Totti N, McCusker K, Campbell E, Griffin G, Senior R. Nicotine is chemotactic for neutrophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides. *Science*. 1984; 223: p. 169-171.
205. Mahapatra S, Das S, Bhattacharjee S, Gautam N, Majumdar S, Roy S. In vitro nicotine-induced oxidative stress in mice peritoneal macrophages: a dose-dependent approach. *Toxicol Mech Methods*. 2009; 19: p. 100-108.
206. Seow W, Thong Y, Nelson R, MacFarlane G, Herzberg M. Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation*. 1994; 18: p. 119-127.
207. Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, Murakami S. Nicotine up-regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 $\beta$  or *P. gingivalis* lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signalling. *Arch Oral Biol*. 2012; 57: p. 483-490.
208. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int*. 2009; 3: p. 526-536.
209. Benowitz N, Gourlay S. Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29: p. 1422-1431.
210. Goette A, Lendeckel U, Kuchenbecker A, Bukowska A, Peters B, Klein H, et al. Cigarette smoking induces atrial fibrosis in humans via nicotine. *Heart*. 2007; 93: p. 1056-1063.
211. Rehan V, Wang Y, Sugano S, Santos J, Patel S, Sakurai R, et al. In utero nicotine exposure alters fetal rat lung alveolar type II cell proliferation, differentiation, and metabolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292: p. 323-333.
212. Carvalho C, Pissolato M, Candido E, Liberti E, Cagnon V. Morphological alterations in the prostate stroma of rats submitted to chronic nicotine treatment. *Microsc Res Tech*. 2012; 75: p. 46-53.

213. Takeuchi H, Kubota S, Murakashi E, Zhou Y, Endo K, Ng P, et al. Nicotine-induced CCN2: from smoking to periodontal fibrosis. *J Dent Res*. 2010; 89: p. 34-39.
214. Zhou Y, Zuo X, Li Y, Wang Y, Zhao H, Xiao X. Nicotine inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  induced IL-6 and IL-8 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2012; 32: p. 97-104.
215. Shin V, Jin H, Ng E, Sung J, Chu K, Cho C. Activation of 5-lipoxygenase is required for nicotine mediated epithelial-mesenchymal transition and tumor cell growth. *Cancer Lett*. 2010; 292: p. 237-245.
216. Apte M, Pirola R, Wilson J. Where there's smoke there's not necessarily fire. *Gut*. 2005; 54: p. 446-7.
217. Anto R, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola C, Aggarwal B. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*. 2002; 23: p. 1511-1518.
218. Allam E, Zhang W, Al-Shibani N, Sun J, Labban N, Song F, et al. Effects of cigarette smoke condensate on oral squamous cell carcinoma cells. *Arch Oral Biol*. 2011; 56: p. 1154-1161.
219. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi Y. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*. 2011; 740: p. 33-43.
220. Rodriguez L, Gu X, Guan J. Wound-Healing Assay. In Guan J, editor. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*. Totowa: Human Press Inc; 2005. p. 23-29.
221. Schwer C, Stoll P, Goebel U, Buerkle H, Hoetzel A, Schmidt R. Effects of hydrogen sulfide on rat pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2012; 41: p. 74-83.
222. Hammond J, Kruger N. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1988; 3: p. 25-32.
223. Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol*. 2009; 44: p. 249-260.
224. Itatsu T, Oide H, Watanabe S, Tateyama M, Ochi R, Sato N. Alcohol stimulates the expression of L-type voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 251: p. 533-537.
225. Hukkanen J, Jacob P3, Benowitz N. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*. 2005; 57: p. 79-115.
226. Roemer E, Schramke H, Weiler H, Buettner A, Kausche S, Weber S, et al.

- Mainstream smoke chemistry and in vitro and in vivo toxicity of the reference cigarettes 3R4F and 2R4F. *Contributions to tobacco Research*. 2012; 25: p. 316–335.
227. Prokopczyk B, Hoffmann D, Bologna M, Cunningham A, Trushin N, Akerkar S, et al. Identification of tobacco-derived compounds in human pancreatic juice. *Chem Res Toxicol*. 2002; 15: p. 677-685.
228. Matta S, Balfour D, Benowitz N, Boyd R, Buccafusco J, Caggiula A, et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*. 2007; 190: p. 269-319.
229. Malfertheiner P, Schütte K. Smoking--a trigger for chronic inflammation and cancer development in the pancreas. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: p. 160-162.
230. Allam E, Delacruz K, Ghoneima A, Sun J, Windsor L. Effects of tobacco on cytokine expression from human endothelial cells. *Oral Dis*. 2013; 19: p. 660-665.
231. Erkan M, Adler G, Apte M, Bachem M, Buchholz M, Detlefsen S, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012; 61: p. 172-178.
232. Deng X, Wang L, Elm M, Gabazadeh D, Diorio G, Eagon P, et al. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Pathol*. 2005; 166: p. 93-106.
233. Perides G, Tao X, West N, Sharma A, Steer M. A mouse model of ethanol dependent pancreatic fibrosis. *Gut*. 2005; 54: p. 1461-1467.
234. Kisseleva T, Brenner D. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5: p. 338-342.
235. Krebs M, Sakurai R, Torday J, Rehan V. Evidence for in vivo nicotine-induced alveolar interstitial fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Exp Lung Res*. 2010; 36: p. 390-398.
236. Lu Y, Ward S, Cederbaum A. Nicotine enhances ethanol-induced fat accumulation and collagen deposition but not inflammation in mouse liver. *Alcohol*. 2013; 47: p. 353-357.
237. Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001; 154: p. 277-283.
238. Caldeira E, Carvalho C, Padovani C, Camilli J, Garcia P, Cagnon V. Morphological alterations in the epithelium of the oral mucosa of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long-term systemic nicotine treatment. *Arch Oral Biol*. 2007; 52: p. 83-89.

239. Roman J, Ritzenthaler J, Gil-Acosta A, Rivera H, Roser-Page S. Nicotine and fibronectin expression in lung fibroblasts: implications for tobacco-related lung tissue remodeling. *FASEB J.* 2004; 18: p. 1436-1438.
240. Michaelson J, Ritzenthaler J, Roman J. Regulation of serum-induced fibronectin expression by protein kinases, cytoskeletal integrity, and CREB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 282: p. L291-301.
241. Jensen K, Afroze S, Ueno Y, Rahal K, Frenzel A, Sterling M, et al. Chronic nicotine exposure stimulates biliary growth and fibrosis in normal rats. *Dig Liver Dis.* 2013; 45: p. 754-761.
242. Batel P, Pessione F, Maître C, Rueff B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction.* 1995; 90: p. 977-980.
243. Marrero J, Fontana R, Fu S, Conjeevaram H, Su G, Lok A. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005; 42: p. 218-224.
244. Wiśniewska E, Dylík A, Kulza M, Florek E, Piekoszewski W, Seńczuk-Przybyłowska M, et al. Exposure to ethanol and tobacco smoke in relation to level of PCNA antigen expression in pancreatic and hepatic rat cells. *Pharmacol Rep.* 2013; 65: p. 914-926.
245. Rose J, Brauer L, Behm F, Cramblett M, Calkins K, Lawhon D. Psychopharmacological interactions between nicotine and ethanol. *Nicotine Tob Res.* 2004; 6: p. 133-144.
246. Schoedel K, Tyndale R. Induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 by ethanol and ethanol-metabolizing CYP2E1 by nicotine: summary and implications. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1619: p. 283-290.
247. Howard L, Micu A, Sellers E, Tyndale R. Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299: p. 542-550.
248. Corrigan W, Coen K, Adamson K. Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res.* 1994; 653: p. 278-284.
249. Söderpalm B, Ericson M, Olausson P, Blomqvist O, Engel J. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behav Brain Res.* 2000; 113: p. 85-96.
250. Elsässer H, Adler G, Kern H. Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas.* 1986; 1: p. 421-429.

251. Jones G. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68: p. 593-602.
252. Kassis J, Lauffenburger D, Turner T, Wells A. Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin Cancer Biol.* 2001; 11: p. 105-117.
253. Siech M, Zhou Z, Zhou S, Bair B, Alt A, Hamm S, et al. Stimulation of stellate cells by injured acinar cells: a model of acute pancreatitis induced by alcohol and fat (VLDL). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297: p. G1163-1171.
254. Jones B, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv.* 2010; 10: p. 263-270.
255. Ceyhan G, Deucker S, Demir I, Erkan M, Schmelz M, Bergmann F, et al. Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis. *Lab Invest.* 2009; 89: p. 347-361.
256. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselín I, Godot V, Capel F, et al. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007; 29: p. 937-943.
257. White G, Tan T, John A, Whatling C, McPheat W, Greaves D. Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling. *Cardiovasc Res.* 2010; 85: p. 825-835.
258. Ashakumary L, Vijayammal P. Effect of nicotine on antioxidant defence mechanisms in rats fed a high-fat diet. *Pharmacology.* 1996; 52: p. 153-158.
259. Husain K, Scott B, Reddy S, Somani S. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol.* 2000; 25: p. 89-97.
260. Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal P, Augusti K. A comparative study of antioxidants S-allyl cysteine sulfoxide and vitamin E on the damages induced by nicotine in rats. *Pharmacology.* 2003; 67: p. 113-117.
261. Andriulli A, Botteri E, Almasio P, Vantini I, Uomo G, Maisonneuve P. Smoking as a cofactor for causation of chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas.* 2010; 39: p. 1205-1210.

