

# Fibrogénesis en la pancreatitis crónica

EVA C. VAQUERO RAYA

Servei d'Aparell Digestiu, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España.

La fibrogénesis pancreática es la huella de la pancreatitis crónica. Esta circunstancia conlleva la sustitución progresiva del parénquima pancreático por matriz extracelular. Desde la reciente identificación de las células estrelladas del páncreas (CEP), se ve a la fibrogénesis pancreática como un proceso activo con posibilidades de actuación terapéutica. La evidencia de que las CEP se activan, se expanden y segregan matriz extracelular durante la fibrogénesis pancreática ha reorientado el interés terapéutico hacia el desarrollo de estrategias que consigan su eliminación.

### Puntos clave

- La fibrogénesis pancreática es un proceso inflamatorio crónico que comporta la sustitución progresiva del parénquima pancreático funcionante por matriz extracelular desorganizada. Ésta es una situación característica y determinante de la pancreatitis crónica.
- Diversas causas y factores de riesgo (alcohol, tabaco, mutaciones genéticas) promueven la fibrogénesis pancreática, pero los mecanismos subyacentes que sustentan el proceso fibrogénico son todavía inciertos.
- Las células estrelladas del páncreas han sido identificadas recientemente como el motor fibrogénico en la pancreatitis crónica por su capacidad de sintetizar matriz extracelular.
- Actualmente, se concibe la fibrogénesis pancreática como un proceso de reparación persistente en el que las células estrelladas se mantienen permanentemente activadas.
- La eliminación de las células estrelladas del páncreas se ha convertido en un objetivo terapéutico que ha dado resultados prometedores en detener o revertir la fibrosis pancreática experimental.

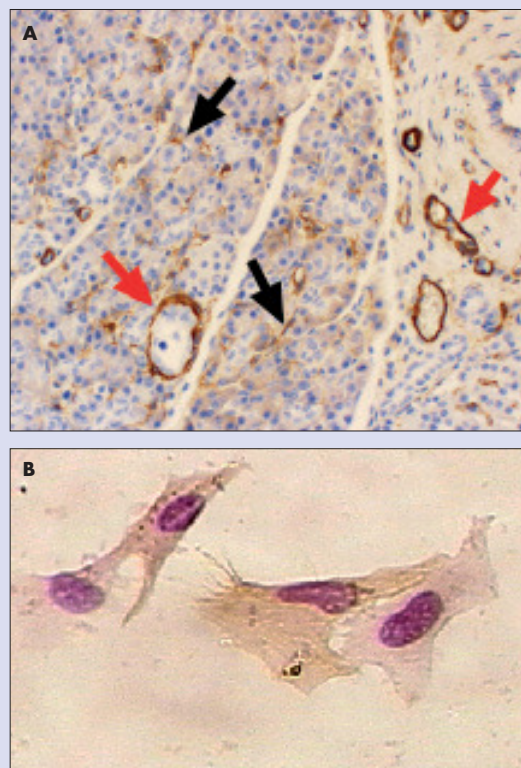
### Naturaleza y origen de la fibrosis pancreática: una lesión mal reparada

Con independencia del factor desencadenante, la fibrosis pancreática es una parte característica y determinante de la pancreatitis crónica. Este hallazgo, considerado durante muchos años como la secuela inerte de una lesión pancreática, actualmente se examina como un acontecimiento biológico de gran interés patogénico en la pancreatitis crónica. La fibrogénesis pancreática es un proceso evolutivo inflamatorio del páncreas que culmina en la destrucción estructural y funcional de la glándula. En ese transcurso es esencial la persistencia de células inflamatorias y la activación de las CEP, cuya colaboración es clave para reemplazar el parénquima pancreático por matriz extracelular desestructurada<sup>1</sup>. Se ha identificado una larga lista de causas y factores de riesgo de pancreatitis crónica (alcohol, tabaco, fármacos, hipercalcemia, polimorfismos genéticos, enfermedades autoinmunitarias, etc.)<sup>2</sup>, pero los mecanismos causales no están del todo definidos. Actualmente la pancreatitis crónica se concibe como el resultado de una respuesta reparadora “defectuosa” y persistente desencadenada por una agresión pancreática inicial<sup>3</sup>. Como en cualquier tejido lesionado, la reparación de una herida pancreática debe conseguir la restitución *ad integrum* del tejido. Ello incluye el depósito de matriz extracelular provisional donde se acumulan células inflamatorias y fibrogénicas y se segregan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento necesarios para regenerar el tejido lesionado<sup>4</sup>. La reparación tisular apropiada concluye con la remodelación del tejido, es decir, con la degradación de la matriz extracelular a cargo de las metaloproteinasas de la matriz<sup>5</sup> y la eliminación de las células redundantes posiblemente mediante apoptosis y/o autofagia<sup>6</sup>. Sin embargo, este proceso ordenado de reparación puede verse distorsionado si la agresión es persistente (p. ej., ingesta crónica de alcohol) y/o si convergen condicionantes ambientales (p. ej., tabaco) o genéticos predisponentes (p. ej., mutaciones de los genes *SPINK1*, *CFTR* o *PRSS1*). En estas circunstancias, la reparación se mantiene en una fase de inflamación persistente que impide la resolución de la lesión.

## Células estrelladas del páncreas y fibrogénesis pancreática

Las CEP representan el motor fibrogénico en la pancreatitis crónica. Estas células, inicialmente interpretadas como fibroblastos reactivos de una lesión tisular<sup>7</sup>, hace menos de una década fueron reconocidas como células con identidad propia y productoras de matriz extracelular en la fibrosis pancreática<sup>8-10</sup>. Las CEP comparten gran similitud morfológica y funcional con las células estrelladas hepáticas, las principales efectoras de la fibrosis hepática<sup>11</sup>. El aislamiento y cultivo de las CEP a partir de páncreas de rata o ratón se ha instaurado como método básico para el estudio *in vitro* de las CEP activas<sup>9,10</sup>. En el páncreas normal, las CEP constituyen el 4% de las células pancreáticas, residen en estado quiescente, tienen localización periácinar, almacenan gotas lipídicas citosólicas ricas en vitamina A y expresan proteínas del citoesqueleto como la desmina, la vimentina y la proteína ácida de la glía fibrilar<sup>9,10</sup>. Ante una lesión pancreática, las CEP se transdiferencian hacia fenotipo activo de tipo miofibroblasto, lo que comporta pérdida del contenido lipídico y expresión de un nuevo patrón de citofilamentos como alfaactina del músculo liso (fig. 1) y nestina<sup>9,10,12</sup>. Las CEP activas tienen la habilidad de proliferar<sup>9,10</sup>, sintetizar matriz extracelular<sup>9,10</sup>, migrar<sup>13,14</sup>, fagocitar<sup>15</sup> y contraerse en respuesta a sustancias vasoactivas como la endotelina<sup>16</sup> o la angiotensina<sup>17</sup>. Las CEP responden vía autocrina<sup>18,19</sup> y paracrina<sup>20</sup> a citocinas y factores de crecimiento<sup>21,22</sup> además de atraer y estimular células inflamatorias<sup>23</sup> (fig. 2). Estos factores solubles segregados a la matriz extracelular son cruciales en perpetuar el proceso fibrogénico una vez eliminado el factor desencadenante. Dos ejemplos de mediadores clave en la fibrogénesis pancreática son TGF $\beta$  (factor beta de transformación del crecimiento), citocina fibrogénica por excelencia<sup>24-27</sup> que fomenta la activación y la síntesis de matriz extracelular en las CEP<sup>10,18,21,22</sup>, y PDGF (factor de crecimiento derivado de los trombocitos), potente mitógeno que promueve la proliferación<sup>22</sup> y la migración de las CEP<sup>13,14</sup>.

La importancia de las CEP en la pancreatitis crónica ha sido corroborada en estudios *in vivo*. En el páncreas de los pacientes con pancreatitis crónica<sup>10,28</sup>, y de los modelos animales de fibrosis pancreática<sup>28-31</sup>, se observa una gran expansión de la población de CEP activas (células positivas por inmunotinción a alfaactina del músculo liso) localizadas en áreas de fibrosis pancreática (fig. 1A). La expansión de las CEP se puede concebir como el balance neto entre la entrada (activación, proliferación) y la salida (muerte) de las CEP en el páncreas en remodelación<sup>32</sup>. El desequilibrio a favor de la proliferación puede propiciarse por factores profibrogénicos como el alcohol (principal causa de pancreatitis crónica) y el estrés oxidativo, los cuales estimulan la activación de las CEP<sup>33,34</sup>. Al efecto fibrogénico del alcohol se añade su interferencia en la degradación de la matriz extracelular formada por las CEP<sup>35</sup>. Es de interés saber si la progresión ilimitada de las CEP no sólo responde a su hiperactivación, sino a una muerte insuficiente para lograr la homeostasis tisular.

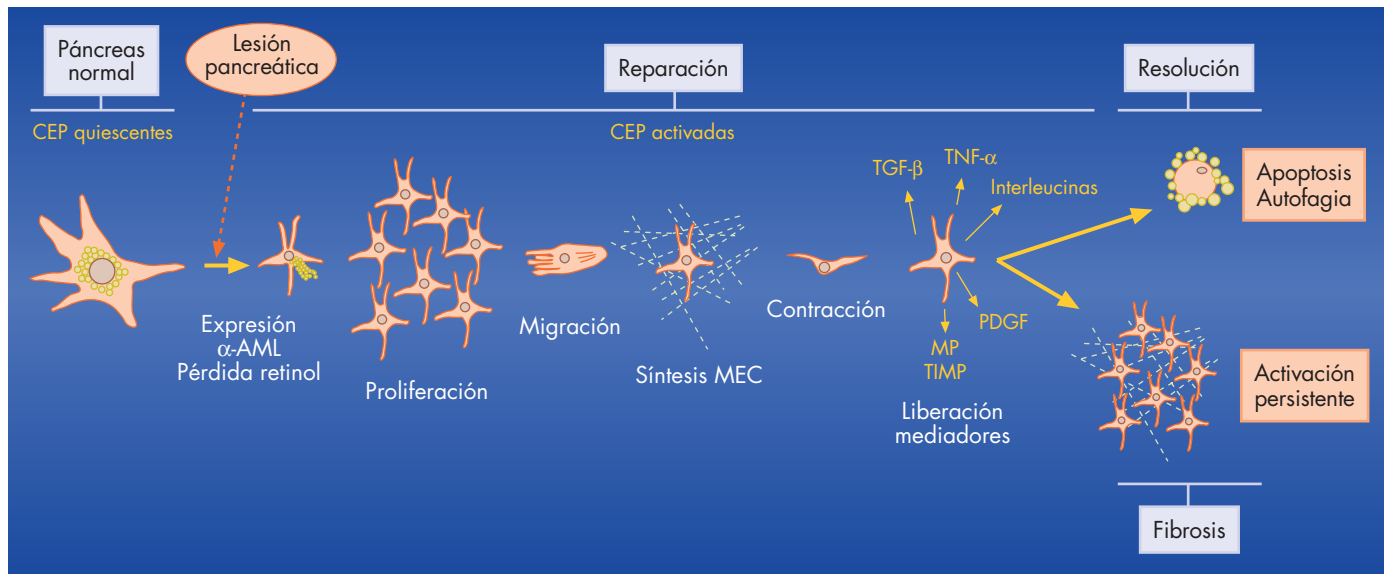


**Figura 1.** Identificación *in vivo* (A) e *in vitro* (B) de las CEP activas mediante inmunotinción de alfaactina del músculo liso. A: páncreas procedente de rata con pancreatitis crónica inducida por la administración de ceruleína y ciclosporina. Obsérvese la expansión de las CEP que rodean los ácinos pancreáticos. Las flechas negras señalan ejemplos de CEP activadas visualizadas en color marrón. Esta marcación debe distinguirse de las células musculares de vasos sanguíneos (flechas rojas), que también se marcan con el anticuerpo contra alfaactina del músculo liso. B: CEP activas en cultivo aisladas de páncreas de rata.

## Terapia experimental en la fibrosis pancreática

No disponemos, por el momento, de tratamientos antifibróticos probados en pacientes con pancreatitis crónica. Por otra parte, la dificultad de obtener tejido pancreático en humanos para cuantificar la fibrosis complica la valoración de terapias antifibrogénicas. No obstante, la demostración de las CEP como efectoras de la fibrosis pancreática ha permitido durante los últimos años la comprobación *in vivo* e *in vitro* de una variedad de moléculas que limitan la actividad de estas células y la fibrosis pancreática experimental (tabla 1). Estos hallazgos ofrecen posibilidades interesantes para la prevención y el tratamiento de la fibrosis pancreática en humanos.

La inhibición del sistema renina-angiotensina, cuyo producto es la angiotensina, ofrece resultados experimentales muy atractivos. La angiotensina es un péptido vasoactivo que estimula la proli-



**Figura 2.** Transición fenotípica y funcional de las células estrelladas del páncreas (CEP) durante el proceso de lesión-reparación pancreática. Ante una lesión pancreática, las CEP se transdiferencian hacia fenotipo activo con la finalidad de reparar la lesión. Las CEP activas expresan alfaactina del músculo liso, pierden el retinol citoplásmico y adoptan la capacidad de proliferar, sintetizar matriz extracelular, migrar, contraerse y segregar mediadores solubles. La reparación normal concluye con la eliminación de las CEP por un proceso de apoptosis y/o autofagia. Por el contrario, la persistencia de las CEP activas conlleva la fibrosis del órgano.  $\alpha$ -AML: alfaactina del músculo liso; MEC: matriz extracelular; TGF- $\beta$ : factor beta transformador de crecimiento; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; PDGF: factor de crecimiento derivado de trombocitos; MP: metaloproteinasas; TIMP: inhibidor tisular de las metaloproteinasas.

**Tabla 1.** Compuestos con efecto antifibrogénico demostrado en la pancreatitis crónica experimental

Mecanismo de acción	Fármaco	Referencia
Inhibidores de la angiotensina	Captopril, lisinopril, losartán, candesartán	38, 39, 40
Agonistas del receptor PPAR $\gamma$	Troglitazona	41
Inhibidores del TGF- $\beta$	Anticuerpos anti-TGF- $\beta$	43
Antioxidantes	Vitamina E (alfatocoferol) Polifenoles (epigallocatequina, ácido elágico)	46 47, 48
Inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa	Lovastatina	49

feración y la contracción de las CEP *in vitro*<sup>36,37</sup>, y este efecto mitogénico puede ser bloqueado con losartán, un antagonista del receptor 1 de la angiotensina II<sup>36</sup>. En estudios *in vivo*, el captopril y el lisinopril (inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina) y el losartán y el candesartán (antagonistas del receptor de la angiotensina) disminuyen la inflamación y la fibrosis pancreática y el número de CEP en modelos de pancreatitis crónica en ratas<sup>38-40</sup>. Agonistas del receptor nuclear PPAR $\gamma$  (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma) como la troglitazona, compuesto utilizado como antidiabético oral, inhibe la actividad de las CEP *in vitro*<sup>41</sup> y disminuye la fibrosis pancreática en ratas<sup>42</sup>. El TGF- $\beta$  se ha utilizado también como diana antifibrogénica por su reconocido poder fibrogénico en el páncreas<sup>24</sup>. La anulación del TGF- $\beta$  con anticuerpos neutralizantes<sup>43</sup> o por manipulación génica<sup>44,45</sup> reduce la fibrosis pancreática experimental. Compuestos antioxidantes, como la vitamina E<sup>34,46</sup> o polifenoles hallados en el té verde<sup>47</sup> o

en frutas y frutos secos<sup>48</sup>, reducen la actividad de las CEP *in vitro* y la fibrosis experimental *in vivo*. Es de destacar la lovastatina, un hipolipemiente con efecto proapoptótico en las CEP<sup>49</sup> que podría ser beneficioso como antifibrogénico en la pancreatitis crónica en humanos.

## Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

- Kennedy RH, Bockman DE, Uscanga L, et al. Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1987;2:61-72.
- Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001;120:682-707.

3. Whitcomb DC. Mechanisms of disease: advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2004;1:46-52.
4. Elsässer HP, Adler G, Kern HF. Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas.* 1986;1:421-9.
5. Muller-Pillasch F, Gress TM, Yamaguchi H, et al. The influence of transforming growth factor beta 1 on the expression of genes coding for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during regeneration from cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas.* 1997;15:168-75.
6. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:2405-19.
7. Elsässer HP, Adler G, Kern HF. Fibroblast structure and function during regeneration from hormone-induced acute pancreatitis in the rat. *Pancreas.* 1986;4:169-78.
8. Saotome T, Inoue H, Fujimiya M, et al. Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas.* 1997;14:373-82.
9. ●● Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* 1998;43:128-33.
10. ● Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 1998;115:421-32.
11. ● Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275:2247-50.
12. Lardon J, Rooman I, Bouwens L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:535-40.
13. Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, et al. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut.* 2003;52:677-82.
14. McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, et al. Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1215-25.
15. ● Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, et al. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2005;128:2105-18.
16. Klonowski-Stumpe H, Reinehr R, Fischer R, et al. Production and effects of endothelin-1 in rat pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2003;27:67-74.
17. Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, et al. Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2004;28:129-37.
18. Shek FW, Benyon RC, Walker FM, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol.* 2002;160:1787-98.
19. Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, et al. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut.* 2003;52:1487-93.
20. Schmid-Kotsas A, Gross HJ, Menke A, et al. Lipopolysaccharide-activated macrophages stimulate the synthesis of collagen type I and C-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells. *Am J Pathol.* 1999;155:1749-58.
21. ● Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, et al. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281:C532-43.
22. ● Apte MV, Haber PS, Darby SJ, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut.* 1999;44:534-41.
23. Sparmann G, Glass A, Brock P, et al. Inhibition of lymphocyte apoptosis by pancreatic stellate cells: impact of interleukin-15. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:6842-51.
24. Menke A, Adler G. TGFbeta-induced fibrogenesis of the pancreas. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002;31:41-6.
25. ● Van Laethem JL, Robberecht P, Résibois A, et al. Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* 1996;110:576-82.
26. Su SB, Motoo Y, Xie MJ, et al. Expression of transforming growth factor-beta in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Dig Dis Sci.* 2000;45:151-9.
27. Satoh K, Shimosegawa T, Hirota M, et al. Expression of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) and its receptors in pancreatic duct cell carcinoma and in chronic pancreatitis. *Pancreas.* 1998;16:468-74.
28. ●● Haber PS, Keogh GW, Apte MV, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol.* 1999;155:1087-95.
29. Vaquero E, Molero X, Tian X, et al. Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats. *Gut.* 1999;45:269-77.
30. Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, et al. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology.* 1997;112:1664-72.
31. Neuschwander-Tetri BA, Bridle KR, Wells LD, et al. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. *Lab Invest.* 2000;80:143-50.
32. ●● Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis—an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* 1998;292:447-52.
33. ● Apte MV, Wilson JS. Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas.* 2003;27:316-20.
34. ● Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, et al. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000;118:780-94.
35. Lugea A, Gukovsky I, Gukovskaya AS, et al. Nonoxidative ethanol metabolites alter extracellular matrix protein content in rat pancreas. *Gastroenterology.* 2003;125:1845-59.
36. Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, et al. Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:905-11.
37. Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, et al. Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2004;28:129.
38. Uesugi T, Froh M, Gabele E, et al. Contribution of angiotensin II to alcohol-induced pancreatic fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311:921-8.
39. ● Yamada T, Kuno A, Ogawa K, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor blocker synergistically suppresses chronic pancreatitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:36-45.
40. Kuno A, Yamada T, Masuda K, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Gastroenterology.* 2003;124:1010-9.
41. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, et al. Protease-activated receptor-2-mediated proliferation and collagen production of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:651-8.
42. Van Westerloo DJ, Florquin S, De Boer AM, et al. Therapeutic effects of troglitazone in experimental chronic pancreatitis in mice. *Am J Pathol.* 2005;166:721-8.
43. Menke A, Yamaguchi H, Gress TM, et al. Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta1 in pancreatitis in the rat. *Gastroenterology.* 1997;113:295-303.
44. Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, et al. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Lab Invest.* 2004;84:1610-8.
45. Yoo BM, Yeo M, Oh TY, et al. Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. *Pancreas.* 2005;30:e71-9.
46. Gómez JA, Molero X, Vaquero E, et al. Vitamin E attenuates biochemical and morphological features associated with the development of chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287:162-9.
47. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate blocks PDGF-induced proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2005;11:3368-74.
48. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, et al. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochem Pharmacol.* 2005;70:869-78.
49. Jaster R, Brock P, Sparmann G, et al. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by the hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor lovastatin. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:1295-303.

## Bibliografía recomendada

**Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* 1998;43:128-33.**

**Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 1998;115:421-32.**

*Ambos artículos identifican y caracterizan por primera vez las células estrelladas del páncreas en la pancreatitis crónica. Proporcionan detalles prácticos para su aislamiento y caracterización inmunohistoquímica.*

**Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, et al. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2005;128:2105-18.**

*Interesante estudio que demuestra la capacidad de las células estrelladas del páncreas de actuar como células fagocíticas locales para limitar la inflamación pancreática. Tras una pancreatitis aguda, las células estrelladas se activan y fagocitan leucocitos polimorfonucleares infiltrados en el páncreas. Este proceso se inhibe por mediadores proinflamatorios (TGF-β, TNF-α, IL-1β) y se estimula por troglitazona, un inhibidor del receptor nuclear PPARγ con probado efecto antifibrótico en la pancreatitis crónica experimental.*

**Whitcomb DC. Mechanisms of disease: advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Practice Gastroenterol Hepatol.* 2004;1:46-52.**

*Interesante revisión que recoge conceptos clínicos y patogénicos sobre el conocimiento actual de la pancreatitis crónica.*

**Yamada T, Kuno A, Ogawa K, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor blocker synergistically suppresses chronic pancreatitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:36-45.**

*Este trabajo demuestra que el tratamiento combinado con lisinopril y candesartán, 2 inhibidores de la angiotensina, disminuye la fibrosis, el número de células estrelladas y la reacción inflamatoria en el páncreas de ratas WBN/Kob que desarrollan de forma espontánea pancreatitis crónica. Este artículo es un ejemplo sobre la posibilidad terapéutica de revertir un proceso fibrótico en evolución.*