



**Facultat de Medicina**  
**Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques**

**EFFECTOS SISTEMICOS DE LA INFLAMACION  
PANCREATICA.  
COMPLICACIONES PULMONARES COMO RESPUESTA A  
LA REACCION INFLAMATORIA LOCAL DEL PANCREAS.**

Tesis doctoral presentada por el doctorando Isidro Martínez Casas para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, dirigida por el Prof. Laureano Fernández-Cruz Pérez y el Dr. Daniel Closa Autet.

Barcelona, Mayo de 2005





Laureano Fernández-Cruz Pérez, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona y Daniel Closa Autet, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada “Efectos sistémicos de la inflamación pancreática. Complicaciones pulmonares como respuesta a la reacción inflamatoria local del páncreas”, realizada por Isidro Martínez Casas para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, está en condiciones de ser presentada y sometida a la aprobación del tribunal convocado.

Lo que se hace constar a todos los efectos, a 26 de Abril de dos mil cinco.

**Prof. Laureano Fernández-Cruz Perez**

Codirector de la tesis

**Dr. Daniel Closa Autet**

Codirector de la tesis



“Solo el que sabe lo que busca  
es capaz de interpretar lo que encuentra”.  
Claude Bernard



A mis padres, Javier y Margarita,  
de quienes guardaré muchísimos tesoros,  
pero sobre todo, el haberme educado en el libre pensamiento  
y la ética que siempre han demostrado.

A mi esposa Auxi, por estar a mi lado  
y ser un estímulo constante.  
A mi hijo Pablo, por las horas  
que esta tesis nos ha robado.



---

## **Agradecimientos**

Al Profesor Dr. Laureano Fernández-Cruz, Catedrático de Cirugía de la Universidad de Barcelona, impulsor y director de la presente tesis, por su fe en ella, por su constante estímulo e ilusión. Agradecerle además las enseñanzas y consejos recibidos durante mi formación como Cirujano General. Pertener a su Servicio y tenerlo como maestro ha sido y sigue siendo motivo de orgullo.

---



---

A los Dres. Daniel Closa Autet, Felip Pí Siqueras y Josep Antoni Bombí Latorre por su paciencia y dedicación durante la realización de esta tesis y por su estrecha colaboración en la enseñanza de los modelos y el procesamiento de las muestras.

Al Dr. Joan Sancho Insenser, maestro y amigo, por haber inculcado en mí la imagen del cirujano-científico-docente, ideal de nuestra profesión. Por su paciencia y lecciones de estadística e informática.

A los Dres. Sergio Hoyos, Gleydson Cesar-Borges, Juan Pablo Pantoja y Galit Even Bendahan, por su apoyo, colaboración y horas compartidas en el estabulario de la Facultad de Medicina de la UB.

A los Dres. Emiliano Astudillo, Alejandro Sáenz, Gerson Benarroch y Salvador Navarro con quienes he compartido los primeros años de profesión, por haber despertado en mí la pasión por la cirugía pancreática y endocrina.

A los Dres. Jaume Bosch Genover y Jesús Menéndez-Hevia por sus consejos y ayuda en los primeros años de mi carrera universitaria.

A los Dres. Juan Carlos Garcia-Valdecasas, Josep Fuster, Luis Grande, Manuel Pera, Joan Martí i Rague, Antonio Lacy, Miguel López-Boado, Xavier González y Ramón Rull, cirujanos con quienes he compartido horas en quirófano, por haber formado entre todos, mi criterio quirúrgico.

A los Dres. Oscar Estrada y Jaime Jimeno, compañeros y amigos, por su comprensión y ayuda en los últimos meses de elaboración de esta tesis.

A mis compañeros Luis Sabater, Miguel Pera, Jordi Ardid, Ernest Bombuy, Emilio Riera, así como al resto de residentes y amigos con quienes he compartido mi trabajo asistencial.

A mis hermanos, Sabas y Margarita, por todo lo vivido hasta ahora y lo que nos queda por vivir. A Alex por su humanidad y cariño, tan especiales para todos nosotros.

A María, porque sin su dedicación a nuestra familia nunca hubiera podido terminar esta tesis.

A Juan, Silvia, Paco, Iván, David y Sergio, porque con su alegría y cariño han aportado a mi persona más que una verdadera familia.

---



---

# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1	<b>FISIOLOGÍA DEL PÁNCREAS EXOCRINO</b>	<b>8</b>
1.1.1	Secreción enzimática de las células acinares	9
1.1.2	Regulación de la secreción exocrina	11
1.1.3	Sistemas de protección frente a la autodigestión pancreática	12
1.2	<b>PANCREATITIS AGUDA</b>	<b>14</b>
1.2.1	Epidemiología	14
1.2.2	Etiología	15
1.2.3	Formas anatómo-clínicas y clasificación actual	18
1.2.4	Fisiopatología	24
1.3	<b>EFFECTOS SISTÉMICOS DE LA PANCREATITIS AGUDA</b>	<b>30</b>
1.3.1	<b>Complicaciones y efectos órgano-específicos de la pancreatitis aguda</b>	<b>31</b>
1.3.1.1	Shock y efectos cardio-vasculares	31
1.3.1.2	Efectos sobre el pulmón	32
1.3.1.3	Efectos sobre el riñón	33
1.3.1.4	Efectos sobre el intestino	34
1.3.1.5	Efectos sobre el hígado	35
1.3.1.6	Alteraciones metabólicas asociadas a pancreatitis aguda	35
1.3.1.7	Otros efectos de la pancreatitis aguda	37
1.3.1.8	Fallo multiorgánico	38
1.3.2	<b>Mediadores de la inflamación implicados en los efectos sistémicos de la pancreatitis aguda</b>	<b>43</b>
1.3.2.1	Componente celular	43
1.3.2.1.1	<i>Sistema monocito-macrófago</i>	43
1.3.2.1.2	<i>Neutrófilos</i>	48
1.3.2.1.3	<i>Célula endotelial</i>	52
1.3.2.2	Componente humoral	55
1.3.2.2.1	<i>Radicales libres de oxígeno</i>	55
1.3.2.2.2	<i>Eicosanoides</i>	66
1.3.2.2.3	<i>Citoquinas</i>	76
1.3.2.2.4	<i>Moléculas de adhesión</i>	91
1.3.2.2.5	<i>Oxido nítrico</i>	94
1.3.2.2.6	<i>Complemento</i>	98
1.3.2.2.7	<i>Proteínas de shock térmico</i>	99
1.3.3	<b>Efectos de la pancreatitis aguda sobre el pulmón</b>	<b>104</b>
1.3.3.1	Características morfológicas y funcionales de la lesión pulmonar en la pancreatitis aguda	105
1.3.3.2	Patogénesis de la lesión pulmonar inducida por la pancreatitis aguda	108
1.3.4	<b>Importancia del hígado en los efectos sistémicos de la pancreatitis aguda</b>	<b>118</b>
1.4	<b>MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN PANCREÁTICA / PANCREATITIS AGUDA</b>	<b>124</b>
1.4.1	<b>Modelos ductales de pancreatitis aguda</b>	<b>125</b>
1.4.1.1	Modelo de infusión ductal retrógrada	125
1.4.1.2	Modelo de obstrucción ductal / hipersecreción	127

1.4.1.3	Modelo de ligadura duodenal .....	128
1.4.1.4	Modelo de perfusión ductal .....	129
<b>1.4.2</b>	<b>Modelos celulares de pancreatitis aguda .....</b>	<b>129</b>
1.4.2.1	Modelo de pancreatitis inducida por dieta.....	129
1.4.2.2	Modelo de hiperestimulación con ceruleina .....	130
<b>1.4.3</b>	<b>Otros modelos de pancreatitis aguda experimental.....</b>	<b>132</b>
1.4.3.1	Modelo de isquemia-reperfusión pancreática .....	132
1.4.3.2	Páncreas ex vivo perfundido y aislado.....	133
1.4.3.3	Modelo de pancreatitis inmune .....	133
<b>1.5</b>	<b>SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN .....</b>	<b>134</b>
1.5.1	Papel de la isquemia en la pancreatitis aguda.....	141
1.5.2	Trasplante de páncreas experimental.....	146
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>153</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>157</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>159</b>
4.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	159
4.2	ANESTESIA .....	160
4.3	MODELOS EXPERIMENTALES .....	161
4.3.1	Modelo de pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico.....	161
4.3.2	Modelo de trasplante pancreático isogénico heterotópico ....	164
4.4	CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL .....	174
4.5	GRUPOS EXPERIMENTALES .....	176
4.5.1	Grupo 1 (C): .....	176
4.5.2	Grupo 2 (P): .....	176
4.5.3	Grupo 3 (ST): .....	177
4.5.4	Grupo 4 (STP):.....	177
4.5.5	Grupo 5 (T):.....	177
4.5.6	Grupo 6 (TPN):.....	178
4.5.7	Grupo 7 (TPI): .....	178
4.6	OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	178
4.7	DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.....	179
4.7.1	Determinaciones plasmáticas.....	179
4.7.1.1	Lipasa.....	179
4.7.1.2	Receptor soluble 1 y 2 del TNF $\alpha$ .....	180
4.7.2	Determinaciones tisulares .....	180
4.7.2.1	Proteínas.....	180
4.7.2.2	Mieloperoxidasa .....	180
4.7.2.3	TNF $\alpha$ m-RNA, IL-6 mRNA y HSP mRNA.....	181
4.8	ESTUDIO HISTOLÓGICO .....	182
4.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	183
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>185</b>
<b>5.1</b>	<b>ESTUDIO DE LA RESPUESTA LOCAL Y SISTÉMICA, A NIVEL HEPÁTICO Y PULMONAR, PRODUCIDA TRAS LA INDUCCIÓN DE UNA PANCREATITIS AGUDA POR ADMINISTRACIÓN INTRADUCTAL DE TAUROCOLATO SÓDICO Y TRAS LA REALIZACIÓN DE UN ISOTRASPLANTE PANCREÁTICO HETEROTÓPICO EXPERIMENTAL....</b>	<b>185</b>
5.1.1	Niveles de lipasa plasmática.....	185
5.1.2	Niveles de mieloperoxidasa pancreática .....	187

5.1.3	Niveles de mieloperoxidasa pulmonar .....	189
5.1.4	Niveles plasmáticos de receptores solubles 1 y 2 del TNF $\alpha$ ..	190
5.1.5	Niveles hepáticos de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70 .....	193
5.1.6	Estudio histológico.....	194
5.2	ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA RESPUESTA SISTÉMICA A LA INFLAMACIÓN PANCREÁTICA EN UN MODELO DE PANCREATITIS AGUDA EN PÁNCREAS NATIVO Y LA RESULTANTE TRAS LA PANCREATITIS AGUDA DE UN INJERTO DE TRASPLANTE PANCREÁTICO.....	197
5.2.1	Niveles de lipasa plasmática .....	197
5.2.2	Niveles de mieloperoxidasa pancreática.....	198
5.2.3	Niveles de mieloperoxidasa pulmonar .....	199
5.2.4	Niveles plasmáticos de receptores solubles 1 y 2 de TNF $\alpha$ ...	200
5.2.5	Niveles de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70.....	203
5.2.6	Estudio histológico.....	203
5.3	ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA SISTÉMICA A LA PANCREATITIS EN PRESENCIA DE TEJIDO PANCREÁTICO VIABLE. COMPARACIÓN ENTRE LA LESIÓN PROVOCADA TRAS LA REALIZACIÓN DE UN TRASPLANTE Y LA ADMINISTRACIÓN INTRADUCTAL DE TAUCOLATO SÓDICO EN EL ÓRGANO NATIVO Y SOBRE EL INJERTO PANCREÁTICO.....	205
5.3.1	Niveles de lipasa plasmática .....	205
5.3.2	Niveles de mieloperoxidasa pancreática.....	206
5.3.3	Niveles de mieloperoxidasa pulmonar .....	207
5.3.4	Niveles plasmáticos de receptores solubles 1 y 2 de TNF $\alpha$ ...	208
5.3.5	Niveles de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70.....	210
5.3.6	Estudio histológico.....	211
6	DISCUSIÓN .....	213
7	CONCLUSIONES .....	237
8	BIBLIOGRAFÍA .....	239

## Abreviaturas

AA:	Acido araquidónico.
ADP:	Adenosín difosfato.
ATP:	Adenosín trifosfato.
C:	Grupo control.
CCK:	Colecistoquinina.
CCR:	Receptor de quemoquinas.
CGRP:	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
CID:	Coagulación intravascular diseminada.
COX:	Ciclooxigenasa.
CSF:	Factor estimulador de colonias (Monocito, Granulocito).
cNOS:	Sintasa constitutiva del óxido nítrico.
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
ELAM:	Molécula de adhesión del leucocito al endotelio.
FAP:	Factor activador plaquetario.
FLA <sub>2</sub> :	Fosfolipasa A <sub>2</sub> .
FMO:	Fallo multiorgánico.
GMPc:	Guanosina mono fosfato cíclico.
GRP:	Péptido liberador de gastrina.
HETE:	Hidroxiácido.
HPETE:	Hidroperóxido.
HSP:	Proteínas de shock térmico.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno.
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular.
IFN:	Interferón.
IL:	Interleuquina.
I/R :	Isquemia-reperfusión.
iNOS :	Sintasa inducible del óxido nítrico.
kDa :	KiloDaltons.
LECAM:	Molécula de adhesión del leucocito al endotelio

LT:	Leucotrieno (A, B...).
MAPK:	Proteínquinasa asociada a los mitógenos.
MCP:	Proteína quimiotáctica de los monolitos.
MIF:	Factor inhibidor de la migración de los macrófagos.
MIP:	Proteína inflamatoria de los macrófagos.
MPO:	Mieloperoxidasa.
m-M:	Monocito-Macrófago (sistema).
mRNA:	Acido ribonucleico mensajero.
NAD:	Nicotin adenin dinucleótido.
NADH:	Nicotin adenin dinucleótido reducido.
NADPH:	Fosfato de nicotin adenin dinucleótido reducido.
NFkb:	Factor nuclear kb.
NO:	Oxido nítrico.
NOS:	Sintasa del óxido nítrico.
NPY:	Neuropéptido Y.
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Radical superóxido.
OH <sup>-</sup> :	Radical hidroxilo.
P:	Grupo de pancreatitis con taurocolato sódico.
PARS:	Poli ADP ribosa sintetasa.
PACAP:	Péptido activador de la adenililciclase de la pituitaria.
PAF:	Factor activador plaquetario.
PAP:	Proteína asociada a la pancreatitis.
PECAM:	Molécula de adhesión entre endotelio y plaqueta.
PDF:	Productos de degeneración del fibrinógeno.
PG:	Prostaglandina (A, B...)
PNM:	Leucocitos polimorfonucleares.
PP:	Péptido pancreático.
RLO:	Radicales libres de oxígeno.
RT-PCR:	retrotranscriptasa de la reacción en cadena de la polimerasa.
RsTNF $\alpha$ :	Receptor soluble del TNF $\alpha$ .
SDRA:	Síndrome del distrés respiratorio del adulto.
SOD:	Superóxido dismutasa.
SRCA:	Síndrome de respuesta compensadora antiinflamatoria.
SRIS:	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

ST:	Grupo de simulación de trasplante.
STP:	Grupo de simulación de trasplante y pancreatitis.
TGF:	factor transformador del crecimiento.
T <sub>H</sub> :	Linfocitos T “helper”.
TMB:	Tetrametilbenzidina.
TNF:	factor de necrosis tumoral.
T:	Grupo de trasplante.
TPI:	Grupo de trasplante y pancreatitis en el injerto.
TPN:	Grupo de trasplante y pancreatitis en el nativo.
TX:	Tromboxano (A, B...).
VCAM:	Molécula de adhesión de las células vasculares.
VIP:	Péptido intestinal vasoactivo.
XDH:	Xantina deshidrogenasa.
XOD:	Xantina oxidasa.

---

# 1 Introducción

El páncreas es una glándula digestiva con funciones endocrinas y exocrinas. La estructura del tejido pancreático exocrino está constituida por acinos secretores de células piramidales que apoyan su base en una membrana reticular y que son el componente celular más numeroso, formando el 80% del órgano adulto. Entre las células acinares existen estrechos canalículos de drenaje, constituidos por células epiteliales ductales, que desembocan en otros de mayor calibre y conducen finalmente al conducto pancreático principal. Estas células ductales son las responsables de la secreción hídroelectrolítica del jugo pancreático<sup>1</sup>. La parte endocrina o insular del páncreas está constituida por distintos grupos celulares dispersos por todo el parénquima, denominados islotes de Langerhans, cuya función es la producción de hormonas polipeptídicas, fundamentalmente la insulina (células B), el glucagón (células A), la somatostatina (células D) y el polipéptido pancreático (células PP), constituyendo el 1-2% del páncreas adulto. Los tres tipos celulares fundamentales del páncreas, células ductales, células acinares y

células insulares presentan un origen embriológico común a pesar de tener estructura y funciones claramente diferenciadas<sup>2</sup>.

## **1.1 Fisiología del páncreas exocrino**

El páncreas exocrino humano secreta entre 1 y 2 litros/día de líquido alcalino acuoso claro, que contiene múltiples enzimas digestivas. El contenido enzimático del páncreas presenta importantes diferencias dependiendo de la especie. Así mismo, en un mismo individuo puede existir una adaptación de la secreción enzimática a los nutrientes mayoritarios de la dieta, fenómeno observado por Pavlov a finales del siglo XIX.

Las enzimas pancreáticas se clasifican en digestivas y lisosómicas según su función y el tipo de moléculas que hidrolizan. Así, entre las **enzimas digestivas** existen enzimas *glucolíticas* como la amilasa, *lipolíticas* como la lipasa, la carboxilesterasa o la fosfolipasa A<sub>2</sub>, *proteolíticas* como la tripsina, la quimotripsina, la elastasa, la calicreina (endopeptidasas) o carboxipeptidasas A y B (exopeptidasas) y *nucleolíticas* como la ribonucleasa o desoxirribonucleasa (fosfodiesterasas). Pero la extraordinaria capacidad del páncreas para la síntesis proteica también se manifiesta por la alta concentración de **enzimas lisosómicas**, entre ellas la N-acetil-β-D-glucosaminidasa, N-acetil-β-D-galactosaminidasa, α-L-fucosidasa, arilsulfatasa, β-D-glucuronidasa y catepsina B. La mayoría de estas enzimas lisosómicas tienen un pH óptimo de carácter ácido, y por tanto no serían activas en el

pH alcalino de la secreción pancreática, por lo que su papel como enzimas digestivas en el lumen duodenal es muy poco probable.

### **1.1.1 Secreción enzimática de las células acinares**

El conjunto de eventos necesarios para la síntesis y excreción de las enzimas pancreáticas es un mecanismo muy conservado en la evolución, descrito por Palade, Claude y DeDuve, a quienes valió la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1974.

El proceso se inicia en el retículo endoplasmático rugoso de la célula acinar, donde las proteínas sintetizadas en forma de precursores sufren modificaciones covalentes que incluyen fenómenos de glucosilación, acilación, ciclación, cambios en las cadenas laterales de aminoácidos centrales y formación de puentes disulfuro. Posteriormente, y mediante la formación de vesículas, estas proteínas llegan al aparato de Golgi. Aquí se produce la fase de maduración, sobre todo mediante fenómenos de glucosilación. El aparato de Golgi está constituido por zonas funcionalmente diferentes, denominadas *cis*-, *mid*- y *trans*-Golgi. En ellas tiene lugar la separación entre enzimas digestivas por un lado y las hidrolasas lisosómicas por otro. Así, en el *cis*-Golgi se produce la fosforilación de proteínas que se diferenciarán a hidrolasas lisosómicas. La separación definitiva entre ambos tipos enzimáticos se produce en el *trans*-Golgi, lugar donde se comienzan a formar las vacuolas condensantes. Pero el mecanismo de separación no es del todo completo y pueden encontrarse gránulos de zimógeno en los que coexistan ambos tipos enzimáticos.

El acontecimiento final de la ruta intracelular de la secreción proteica es la exocitosis, proceso en el cual los gránulos de zimógeno se fusionan a la membrana plasmática apical de la célula acinar. Existen dos rutas de secreción desde el *trans*-Golgi al lumen acinar, por un lado la ya descrita de los gránulos zimógenos y por otro la denominada “secreción constitutiva”, que opera mediante la exocitosis de vesículas de menor tamaño y sin depender de ningún estímulo, pudiendo ser responsable parcial de la secreción basal de proteínas del páncreas exocrino<sup>3</sup> (figura 1).

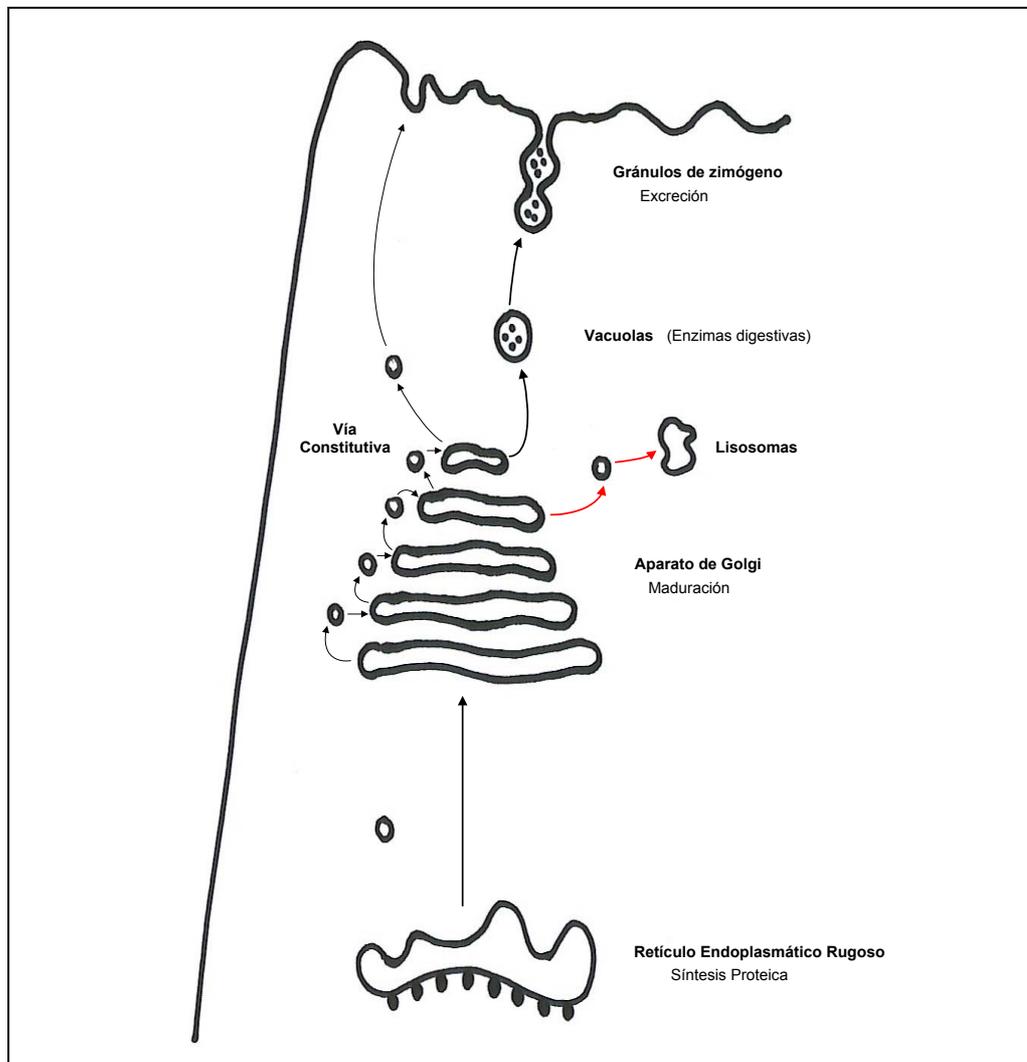


Figura 1. Síntesis y liberación celular de enzimas digestivas y lisosomales.

### 1.1.2 Regulación de la secreción exocrina

La secreción exocrina pancreática está sujeta a regulación por parte de diversas sustancias que actúan a diferentes niveles y mediante mecanismos de origen nervioso y hormonal (tabla 1).

Tabla 1. Sustancias estimulantes e inhibidoras de la secreción pancreática exocrina.

Estimulantes	Inhibidores
<p>Agentes colinérgicos</p> <p>Secretina</p> <p>Colecistoquinina (CCK)</p> <p>Péptido intestinal vasoactivo (VIP)</p> <p>Péptido liberador de gastrina (GRP)</p> <p>PACAP</p> <p>Insulina</p> <p>Motilina</p>	<p>Agentes adrenérgicos</p> <p>Polipéptido pancreático (PP)</p> <p>Neuropéptido Y (NPY)</p> <p>CGRP</p> <p>Somatostatina</p> <p>Péptidos opioides</p> <p>Glucagón</p>

PACAP: Péptido Activador de la Adenilil Ciclasa de la Pituitaria.

CGRP: Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina.

Las dianas finales de estos mecanismos reguladores son las células acinares, las células ductales, las neuronas de los ganglios intrapancreáticos y las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

El páncreas es un órgano ricamente innervado, con innervación *extrínseca* (nervio vago y nervios espláncnicos) e *intrínseca* (fibras nerviosas y ganglios intrapancreáticos). La estimulación vagal aumenta la

secreción pancreática exocrina, mientras que los efectos de la actividad simpática (nervios esplácnicos) son inhibidores de la misma. Los efectos sobre los plexos nerviosos intrapancreáticos son mediados por diversos neuropéptidos (VIP, NPY, entre otros).

Entre los factores hormonales de regulación hay que destacar el papel estimulante de la secretina, responsable de la mayor parte de la secreción de fluido y bicarbonato del jugo pancreático; de la colecistoquinina, estimulante mayoritario en la fase intestinal de la secreción enzimática del páncreas; y el efecto inhibitor del polipéptido pancreático, a través de su acción sobre las neuronas postganglionares intrapancreáticas, frenando la liberación de acetilcolina<sup>4</sup>.

### **1.1.3 Sistemas de protección frente a la autodigestión pancreática**

Existen diversos mecanismos fisiológicos por los cuales las células acinares están protegidas de la acción prematura de las enzimas digestivas pancreáticas. En primer lugar, desde su origen en el retículo endoplasmático rugoso hasta el polo apical de la célula donde son liberadas, las enzimas se encuentran contenidas por una membrana, constituyendo los **gránulos de zimógeno**, lo que protege al medio celular de su acción lítica.

En segundo lugar, muchas de estas enzimas se sintetizan como **precursores inactivos**. La *tripsina* juega un papel clave en la activación de estas proenzimas. Esta enzima es sintetizada así mismo en forma de su precursor, el tripsinógeno, que no se cataliza normalmente a tripsina

hasta hallarse en la luz duodenal, en presencia de la enteroquinasa. En ese momento se activa una cascada en la que se produce la activación de otras enzimas (figura 2).

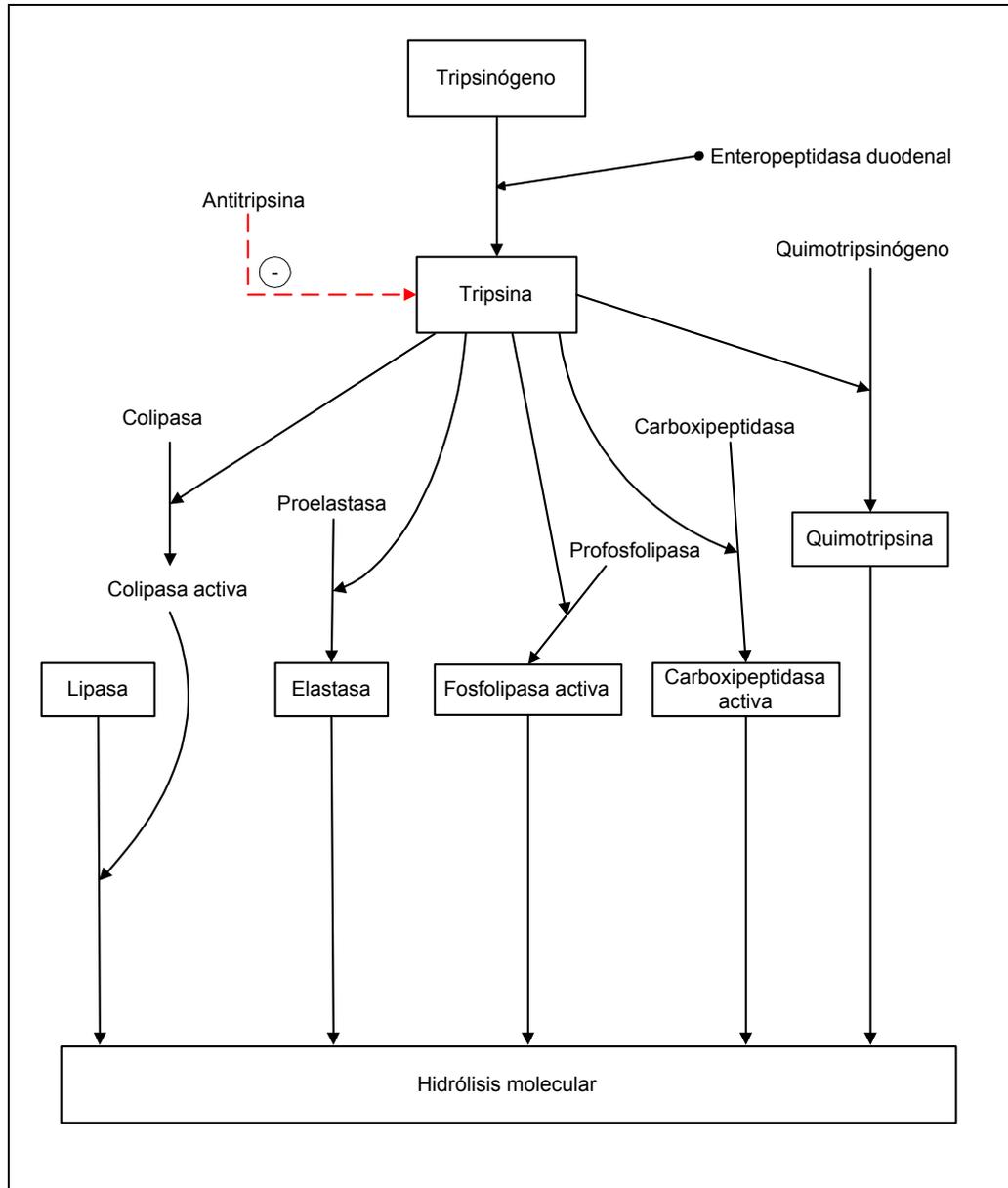


Figura 2. Interrelación de las enzimas de secreción pancreática.

En tercer lugar cabe mencionar la existencia mecanismos de **inhibición enzimática** como la  $\alpha_1$ -*antitripsina*, cuya presencia en el jugo pancreático contrarresta la acción prematura de las enzimas. Así mismo, estudios experimentales han constatado la presencia de inhibidores

enzimáticos de las proteasas a nivel de plasma y la existencia de mecanismos de “bio-feedback” de las propias proteasas sobre la secreción pancreática, mediados por la colecistoquinina<sup>5</sup>.

## **1.2 Pancreatitis aguda**

La diferenciación histológica y funcional de la glándula pancreática permite la clasificación de su patología según afecte a la parte endocrina o exocrina, aunque ambas partes pueden verse afectadas de forma conjunta en múltiples procesos. La disfunción endocrina más importante por su frecuencia e implicaciones es la afectación de las células B, dando lugar a la diabetes mellitus. Por otra parte, la patología del páncreas exocrino es fundamentalmente de tipo inflamatorio y tumoral.

La pancreatitis aguda es un proceso inflamatorio súbito de la glándula pancreática cuyo síntoma principal es el dolor abdominal, y cuyo diagnóstico se fundamenta en la detección de enzimas pancreáticos elevados en sangre y orina. En 1889, Reginald Fitz realizó la primera descripción de la enfermedad y a pesar de ello, más de un siglo después, aún no se conocen con precisión los mecanismos patogénicos y fisiopatológicos que la producen<sup>6</sup>.

### **1.2.1 Epidemiología**

La importancia de la pancreatitis aguda viene determinada por su frecuencia, una incidencia creciente en los últimos 25 años quizás en parte mediada por los avances en técnicas diagnósticas, y una importante tasa de complicaciones y mortalidad que no ha variado en la última

década<sup>7</sup>. La incidencia de la pancreatitis aguda varía según los criterios diagnósticos empleados y las áreas geográficas estudiadas<sup>8,9</sup>.

En España la incidencia de la enfermedad es de alrededor de 383 casos por millón de habitantes y año<sup>10</sup>, aunque presenta variaciones según las series. Así, Gatell establece, tras un estudio retrospectivo entre los años 1975 y 1978, una incidencia de 50 casos por millón de habitantes y año en la región de Barcelona<sup>11</sup>. Frente a ello Mínguez presenta una incidencia de 451 casos por millón de habitantes y año en un estudio prospectivo realizado en Alicante durante 1991. Esta variabilidad también se hace patente en estudios internacionales<sup>12</sup>.

La pancreatitis aguda incide con más frecuencia sobre una población relativamente joven, entre los 30 y 70 años, con una media de 55 años. La distribución por sexos es similar, aunque según la época de la vida puede ser más frecuente en uno u otro sexo. Así, se considera que antes de los 50 años es más frecuente en varones y está en relación con la etiología alcohólica, mientras que por encima de esa edad es más frecuente en mujeres y se relaciona con la litiasis biliar<sup>13,14</sup>.

### **1.2.2 Etiología**

Los factores etiológicos de la pancreatitis aguda son muy variados (tabla 2). En nuestro medio la litiasis biliar y el alcoholismo son los agentes etiológicos más frecuentes, sumando hasta el 80% de los casos.

La asociación entre **litiasis biliar** y pancreatitis aguda ha sido ampliamente estudiada. Entre el 35 y 50% de las pancreatitis aguda tienen su etiología en la litiasis biliar, aunque solo un pequeño porcentaje de los pacientes con litiasis desarrollarán la enfermedad<sup>15</sup>. En el año 1901

Tabla 2. Causas de pancreatitis aguda y su mecanismo de acción

<b>Factor etiológico</b>	<b>Mecanismo</b>
Litiasis biliar	Reflujo biliar o duodenal Dieta, malnutrición Toxicidad directa Hipersecreción
Medicamentos Azatioprina, metronidazol Tetraciclinas, sulfonamidas Tiazidas, furosemida Sulindac, salicilatos Sulfasalacina, 5-ASA Estrógenos, ácido valproico Calcio, tamoxifeno	Toxicidad directa
Procedimientos médicos	CPRE Biopsia pancreática
Causa metabólica Hiperlipidemia Hiperparatiroidismo Embarazo	Hipercalcemia
Infecciones Virus: Herpes, CMV, Parotiditis, Coxackie. Bacterias: Micoplasma, Legionella, Leptospira, Salmonella Hongos: <i>Aspergillus</i> Parásitos: <i>Ascaris*</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Cryptosporidium</i>	Toxicidad directa       *Obstrucción ductal
Alteraciones anatómicas Páncreas divisum, páncreas anular Divertículos duodenales Quistes de colédoco	Obstrucción ductal
Traumatismos o cirugía abdominal	
Enfermedad vascular Isquemia/hipoperfusión Vasculitis, trombopenias Hemólisis	Hipoxia tisular (lesión endotelial)
Enfermedades hereditarias Fibrosis quística, déficit de $\alpha$ 1-antitripsina	
Tóxicos Estricnina Veneno de escorpión	Efecto anticolinérgico
Idiopática	

Opie describió como el paso de las litiasis a través del conducto biliar podría provocar su impactación temporal en la papila, causando el reflujo biliar dentro del conducto pancreático y produciendo la activación inadecuadamente temprana de las proenzimas pancreáticas<sup>16-18</sup>. La relación causa-efecto está apoyada por el hecho de que la colecistectomía y eliminación de las coledocolitiasis previene la recurrencia de episodios.

El **alcohol** es la segunda causa de pancreatitis aguda en nuestro medio, si bien su prevalencia como agente causal es de primer orden en muchos países<sup>19</sup>. El mecanismo de su toxicidad no está totalmente aclarado, pero recientemente se ha descrito que a nivel del acino pancreático altera el equilibrio entre las enzimas proteolíticas y las proteasas inhibitoras, provocando una activación prematura de las primeras, proceso en el que estaría involucrada la colecistoquinina, que vería potenciado su efecto por el alcohol. Así mismo, a partir del alcohol se generan metabolitos tóxicos como el acetaldehído, que detonarían el estrés oxidativo causando pancreatitis<sup>20</sup>. El alcohol produce un aumento de la secreción ácida gástrica, que al llegar al duodeno estimularía la secretina, que a su vez aumentaría la secreción pancreática. Por otra parte, el alcohol incrementa la contracción del esfínter de Oddi, que provocaría la obstrucción de la secreción pancreática sobre-estimulada, creando una hiperpresión ductal responsable de la pancreatitis.

Entre otras causas de pancreatitis aguda cabe destacar diversos **medicamentos** como la azatioprina<sup>21</sup>, la furosemida, o las tetraciclinas<sup>22</sup>, existiendo más de 90 fármacos relacionados con esta enfermedad. Sus

mecanismos de acción son variados, como la hipersensibilidad en el caso de la azatioprina, o por acumulación de metabolitos tóxicos con el ácido valproico, no siendo siempre conocidos. Los **traumatismos** sobre la glándula<sup>23</sup>, incluyendo la cirugía mayor abdominal, causan pancreatitis por la compresión del páncreas sobre la columna vertebral, que ocasionaría la ruptura del sistema ductal<sup>24</sup>. Las **alteraciones anatómicas** del duodeno y de las vías biliar y pancreática, como retracciones duodenales por ulcus péptico, divertículos duodenales o el páncreas divisum son causa de la enfermedad, aunque recientemente algunos autores ponen en duda su relación directa con la pancreatitis aguda<sup>25</sup>. También causan pancreatitis las **alteraciones del metabolismo lipídico o cálcico** como la hipertrigliceridemia<sup>26</sup> o la hipercalcemia. También se ha observado asociación a **otras enfermedades** como vasculitis, hipertensión, arterioesclerosis, trasplante renal y a diversos **agentes infecciosos** (Virus Coxackie, ECHO, CMV, VIH, áscaris, Candida albicans). La práctica de **exploraciones invasivas** sobre el páncreas, como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica se ha asociado a un 1-3'5% de pancreatitis aguda posterior<sup>27</sup>. En alrededor de un 10% de los casos no se encuentra agente causal, siendo entonces consideradas **idiopáticas**.

### 1.2.3 Formas anatómo-clínicas y clasificación actual

La presentación morfológica y clínica de la pancreatitis aguda es muy diversa, así como la evolución de la enfermedad es de difícil predicción. Estos hechos han dificultado enormemente el estudio de la enfermedad. El patrón de hallazgos histopatológicos es muy variable entre pacientes e irregular dentro de la misma glándula. Con mayor

frecuencia, la pancreatitis aguda se manifiesta en una forma leve y autolimitada, caracterizada macroscópicamente por edema pancreático y peripancreático, y microscópicamente por edema intersticial y escaso infiltrado inflamatorio. Sin embargo, en el 15-20% de los casos, el proceso es más severo, apareciendo focos más o menos extensos de necrosis con hemorragia pancreática y/o peripancreática, así como manifestaciones sistémicas potencialmente mortales<sup>28, 29</sup>.

Esta variabilidad de presentación clínica ha motivado que durante muchos años existan disparidad de conceptos, definiciones y clasificaciones. Con el objetivo de eliminar esta confusión se han celebrado múltiples reuniones internacionales de expertos tanto en investigación biológica básica como médicos gastroenterólogos, anatomopatólogos, radiólogos y cirujanos. Entre ellas cabe citar las celebradas en Marsella en 1963 y en 1984 y la de Roma en 1985<sup>30</sup>. Sin embargo, no es hasta 1992, en el Simposium Internacional sobre Pancreatitis Aguda de Atlanta, cuando se proponen las definiciones vigentes en la actualidad y un sistema de clasificación basado en la clínica y aplicable tanto por médicos clínicos como por los investigadores<sup>31</sup>.

Entre las conclusiones de esta reunión destacan los siguientes conceptos clínicos:

- **Pancreatitis aguda:** proceso inflamatorio agudo del páncreas, con afectación variable de otros tejidos regionales u órganos a distancia. Clínicamente se manifiesta por la aparición súbita de dolor abdominal, acompañado con frecuencia de vómitos, fiebre, taquicardia,

leucocitosis y elevación de los enzimas pancreáticos en sangre y/o orina.

- **Pancreatitis aguda leve:** inflamación glandular asociada a una mínima disfunción orgánica, con recuperación completa y ausencia de complicaciones sistémicas o locales. Clínicamente se caracteriza por su buena respuesta a la administración de líquidos y rápida remisión de la sintomatología y parámetros bioquímicos. Histológicamente se caracteriza por edema intersticial pudiéndose hallar áreas microscópicas de necrosis glandular. Supone alrededor del 75% de los casos en la práctica clínica.
- **Pancreatitis aguda grave:** forma de pancreatitis aguda en el curso de la cual aparecen signos y síntomas de fallo orgánico y/o complicaciones locales o sistémicas. Su mortalidad puede alcanzar el 50%. Clínicamente cursa como abdomen agudo, con defensa y distensión abdominal, descompresión abdominal positiva y disminución o ausencia de peristaltismo. La gravedad de esta variedad de pancreatitis aguda ha conducido a numerosos autores a definir escalas de parámetros bioquímicos o clínicos para su diagnóstico. Destacar entre ellas las escalas de Ranson<sup>32</sup>, Blamey<sup>33</sup> o Imrie<sup>34</sup>. Otros grupos prefieren la utilización de escalas de severidad generales como el APACHE II<sup>35,36</sup>, o el MOSF (Multi-Organ-System-Failure), sistema de puntuación del fallo multiorgánico<sup>37</sup>. Se considera grave a un paciente si presenta más de tres criterios en las escalas de Ranson o Imrie, o una puntuación superior a 8 en el APACHE II. Algunos autores prefieren emplear parámetros únicos como la Proteína C

reactiva o la elastasa de los polimorfonucleares<sup>38</sup>. Se define **fallo orgánico** como la presencia de uno o más de los siguientes: *shock* (tensión arterial sistólica < 90 mmHg), *insuficiencia respiratoria* (Presión arterial de oxígeno < 60 mmHg), *insuficiencia renal* (creatinina sérica > 2 mg/dl tras rehidratación) o *hemorragia digestiva* > 500 ml en 24 horas. Esta forma de pancreatitis aguda puede considerarse la expresión clínica de la **necrosis pancreática**, área local o difusa de parénquima pancreático inviable asociado característicamente a necrosis de la grasa peripancreática. Microscópicamente se caracteriza por una desvitalización del parénquima pancreático afectando a células acinares, islotes y conductillos, necrosis grasa intersticial y lesiones vasculares. La tomografía computerizada helicoidal con contraste endovenoso es la exploración complementaria más precisa para la evaluación y diagnóstico de la necrosis pancreática, con una sensibilidad superior al 90% para la detección de zonas bien delimitadas de parénquima pancreático, no intensificadas tras la administración de contraste y de un tamaño superior a 3 cm, que corresponderían a la necrosis<sup>39,40</sup>.

En Atlanta también se logró el consenso en la definición anatómico-clínica de las complicaciones locales y sistémicas de la pancreatitis aguda. Además de la necrosis pancreática en sí, entre las complicaciones locales destacan:

- **Exudados pancreáticos:** colecciones líquidas pancreáticas o peripancreáticas que aparecen precozmente en el curso de la enfermedad. Se producen en el 30 – 50% de pacientes con

pancreatitis grave y su característica principal es que carecen de pared de tejido inflamatorio o fibroso que las delimite. Generalmente evolucionan a la reabsorción espontánea, si bien pueden progresar a pseudoquistes o abscesos pancreáticos.

- **Pseudoquiste:** colección de líquido rica en enzimas pancreáticos y usualmente estéril, delimitada por una pared de tejido fibroso o de granulación. Son formaciones ovoideas ocasionalmente palpables que se diagnostican mediante ecografía o tomografía computerizada. Su aparición es tardía, a partir de la cuarta semana de la enfermedad.
- **Absceso pancreático:** colección de pus intraabdominal próxima al páncreas “en ausencia de necrosis pancreática”. Aparece habitualmente después de la cuarta semana de evolución y tiene su origen en un área más o menos limitada de necrosis, con subsiguiente licuefacción y posterior infección del detritus tisular. Se manifiesta como una infección y su diagnóstico se basa en exploraciones radiológicas, donde aparecen como colecciones de líquido espeso, y cultivos positivos. La diferenciación entre absceso pancreático y necrosis infectada es importante por dos motivos, por un lado la mortalidad de la necrosis infectada es muy superior a la del absceso y por otro la actitud terapéutica en ambas situaciones es diferente. La **necrosis infectada** es una complicación grave de la pancreatitis, indistinguible de la necrosis estéril excepto por la presencia de cultivo por punción positivo. Su tratamiento es quirúrgico.

Las complicaciones sistémicas más frecuentes son pulmonares (atelectasia, neumonía, derrame pleural, hipoxia, síndrome del distrés

respiratorio del adulto (SDRA)), renales (oliguria, aumento de la urea), cardiocirculatorias (retención de líquidos, taquicardia, hipotensión, arritmias cardíacas, shock), hematológicas (coagulación intravascular diseminada = plaquetas  $< 100.000 /\text{mm}^3$  + fibrinógeno  $< 1 \text{ gr/L}$  + productos de degeneración del fibrinógeno  $> 80 \mu\text{g/mL}$ ) o metabólicas (hipocalcemia  $< 7.5 \text{ mg/dl}$ , hiperglicemia, acidosis, hipertrigliceridemia).

La evolución de la pancreatitis aguda y sus complicaciones se resume en la figura 3.

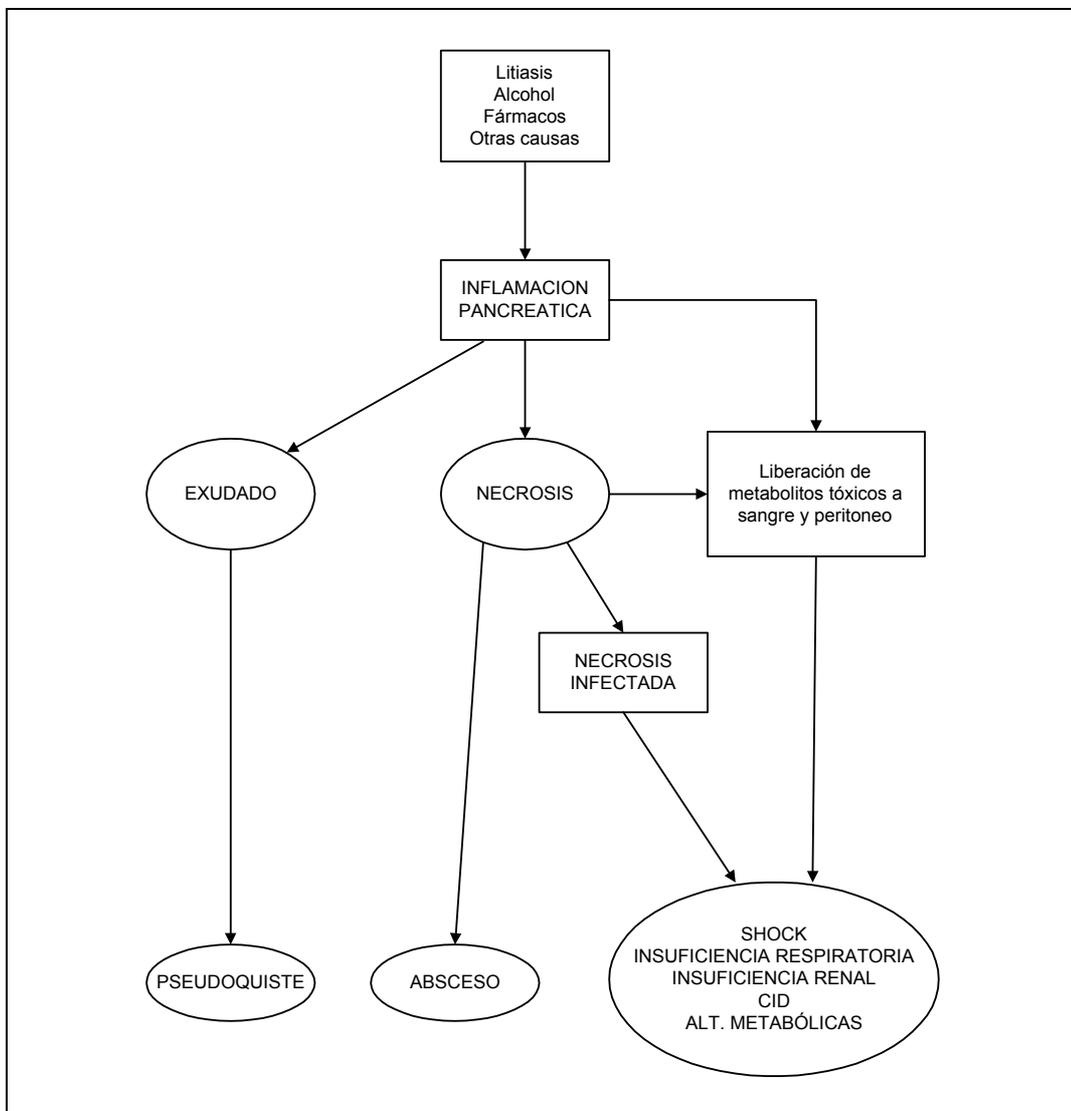


Figura 3. Evolución de las complicaciones de la pancreatitis aguda.

Por último, mencionar que en Atlanta se recomendó abandonar algunos términos ambiguos, tales como pancreatitis hemorrágica, flemón pancreático o pancreatitis aguda persistente.

#### **1.2.4 Fisiopatología**

La patogenia de la pancreatitis aguda es un proceso complejo y multifactorial, no del todo conocido en la actualidad.

Las células acinares del páncreas exocrino sintetizan, almacenan y secretan multitud de enzimas. La idea de que activación prematura de los enzimas proteolíticos y lipolíticos da lugar a la “autodigestión glandular”, sugerida por Chiari en 1896, se ha considerado clásicamente esencial para la aparición y desarrollo de la pancreatitis aguda. Ello se sustenta en diferentes evidencias indirectas, por ejemplo: la identificación de concentraciones anormalmente altas de las formas activas de estas enzimas en el suero, jugo pancreático, líquido ascítico y parénquima pancreático de los pacientes con pancreatitis aguda; o la observación experimental de que las lesiones aparecidas en la pancreatitis aguda se pueden explicar por los efectos de las diferentes enzimas, tanto a nivel local<sup>41</sup> como sistémico<sup>42</sup>. De todas formas, aún no se dispone de evidencias directas que señalen a las enzimas pancreáticas como causantes de la lesión y que excluyan la posibilidad de que su activación prematura tenga lugar como consecuencia del daño celular.

Existen tres teorías clásicas, basadas en la etiología litiásica, que intentan explicar el mecanismo por el cual se provoca la pancreatitis aguda. La *teoría del canal común*<sup>16</sup> según la cual la obstrucción del conducto común bilio-pancreático produciría el reflujo de bilis al conducto

pancreático y la presencia en él de sustancias activadoras de las proenzimas pancreáticas. La *teoría del reflujo duodenal* sugiere la incompetencia del esfínter de Oddi, lo que permite el paso de líquido duodenal rico en enzimas pancreáticas activadas hacia el páncreas<sup>43</sup>. La *teoría de la obstrucción ductal* implica que la secreción de jugo pancreático sin posibilidad de salida al intestino provocaría una hiperpresión ductal que conduciría a la pancreatitis<sup>44</sup>. Sin embargo, ninguna de estas tres teorías puede considerarse general para la pancreatitis aguda, existiendo otros mecanismos implicados en otras etiologías (tabla 2).

La localización de las lesiones en el transcurso de la pancreatitis aguda parece situarse inicialmente a nivel de las células acinares<sup>45</sup> y posteriormente a nivel perilobular y periductal. Para que tenga lugar la activación de las enzimas pancreáticas en la propia célula es necesario que se pierda la homeostasis del proceso de secreción de gránulos de zimógeno, así como la co-localización de los zimógenos con la tripsina activada. Diferentes estudios experimentales han puesto de manifiesto que la síntesis proteica y las fases iniciales del transporte intracelular de zimógenos no están alteradas durante la pancreatitis, sin embargo, la compartimentación, diferenciación y separación de los gránulos si lo está<sup>46,47</sup>. En condiciones normales, las enzimas digestivas y las hidrolasas lisosómicas son separadas a nivel del complejo de Golgi. En él, las hidrolasas son glicosiladas y fosforiladas en la posición 6 de los residuos de manosa, quedando almacenadas finalmente en los lisosomas, mientras que los zimógenos digestivos no son fosforilados y pasan a

través del Golgi siendo condensados en vacuolas que en su camino a la superficie celular se convertirán en gránulos de zimógeno<sup>48</sup>. Durante la pancreatitis ambos tipos de enzimas se condensan en frágiles vacuolas intracelulares<sup>45,49</sup> (figura 4).

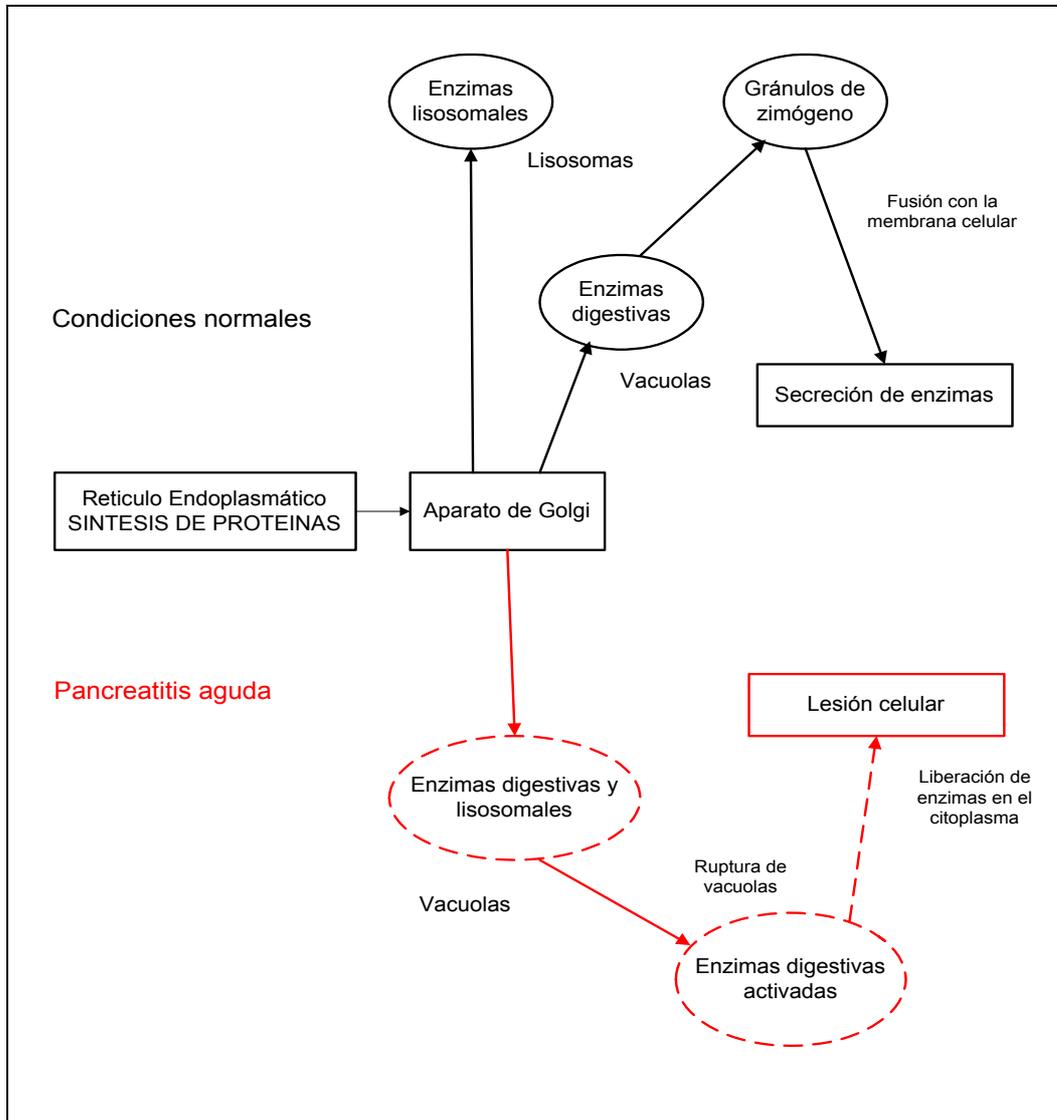


Figura 4. Síntesis y liberación enzimática en condiciones normales y durante la pancreatitis aguda.

En este contexto, la conversión intracelular del tripsinógeno a tripsina se puede producir, bien por la acción de hidrolasas como la catepsina B<sup>50</sup> o por la activación del tripsinógeno dependiente de pH<sup>51</sup>. La tripsina activa al resto de zimógenos y se produce la ruptura intracelular

de las vacuolas liberándose los enzimas en forma activa, dando lugar a la lesión celular que desencadena la pancreatitis aguda.

Una hipótesis alternativa sugiere que el evento inicial de la pancreatitis es la activación de proteasas a nivel intersticial, y no intracelular, mecanismo mediado en parte por los macrófagos<sup>52</sup>. Existen evidencias experimentales de que la inhibición de las enzimas pancreáticas liberadas a la luz intestinal en animales sujetos a shock disminuye su mortalidad<sup>53</sup>. Se ha sugerido también que la liberación de tripsina al torrente circulatorio desencadenaría la activación de otras enzimas y células inflamatorias que producirían mediadores que actuando sobre diferentes órganos darían lugar a las manifestaciones sistémicas de la pancreatitis<sup>54</sup>. Así, la activación de la fosfolipasa A2 por la tripsina se ha relacionado con la lesión pulmonar<sup>55</sup>, la liberación de la lipasa provoca la necrosis grasa peripancreática o la activación de la calicreina por la tripsina produce liberación de bradicinina causando inestabilidad hemodinámica<sup>56</sup>.

Sin embargo, la hipótesis de que las enzimas pancreáticas, y fundamentalmente la tripsina, son las responsables de las lesiones de la pancreatitis aguda tanto a nivel local como sistémico, ha sido ampliamente cuestionada<sup>57</sup>. Un hecho fundamental que impide validar esta hipótesis es el fracaso de los tratamientos basados en la inhibición de las proteasas, como el Gabexato<sup>58</sup>. Así mismo, existen evidencias experimentales en contra de esta hipótesis. Por ejemplo la inducción de pancreatitis en animales deficientes del gen de la catepsina B, que muestran una reducción del 80% en la actividad tripsina del páncreas y

del 50% en las concentraciones plasmáticas de amilasa y lipasa, no impide el proceso de apoptosis de las células pancreáticas, ni modifica la infiltración tisular por células inflamatorias, ni disminuye la intensidad de los efectos sistémicos de la pancreatitis<sup>59</sup>.

En la actualidad existen evidencias de que la pancreatitis aguda no es únicamente un proceso autodigestivo, sino que muchos de sus efectos se producen tras la liberación de diferentes mediadores inflamatorios por parte de células activadas del sistema inmunológico como respuesta a la lesión tisular provocada en el páncreas. De hecho, el fallo multiorgánico característico de la pancreatitis aguda grave no se diferencia del que aparece en otras circunstancias, como la sepsis, los grandes quemados o politraumáticos graves, donde no se produce liberación de enzimas digestivas por el páncreas. Este enfoque fisiopatológico sitúa al linfocito activado como el elemento clave que convierte las lesiones locales iniciadas en el páncreas en un proceso sistémico (figura 5).

Además ha permitido poner de manifiesto el papel de multitud de sustancias mediadoras y efectoras como los metabolitos del ácido araquidónico<sup>60</sup>, el óxido nítrico<sup>61</sup>, los radicales libres de oxígeno<sup>62</sup> y especialmente las citoquinas<sup>63</sup> y las moléculas de adhesión<sup>64</sup>. Todas estas sustancias intervienen en el desarrollo de las complicaciones de la pancreatitis aguda, si bien su importancia como iniciadoras del proceso no esta claramente determinada.

Finalmente, destacar el protagonismo que ha adquirido en la última década la célula endotelial. Estas células constituyen la primera barrera entre la sangre y el espacio extravascular, manteniendo la integridad

funcional y estructural de la circulación y contribuyendo al equilibrio local inflamatorio-antiinflamatorio<sup>65</sup>.

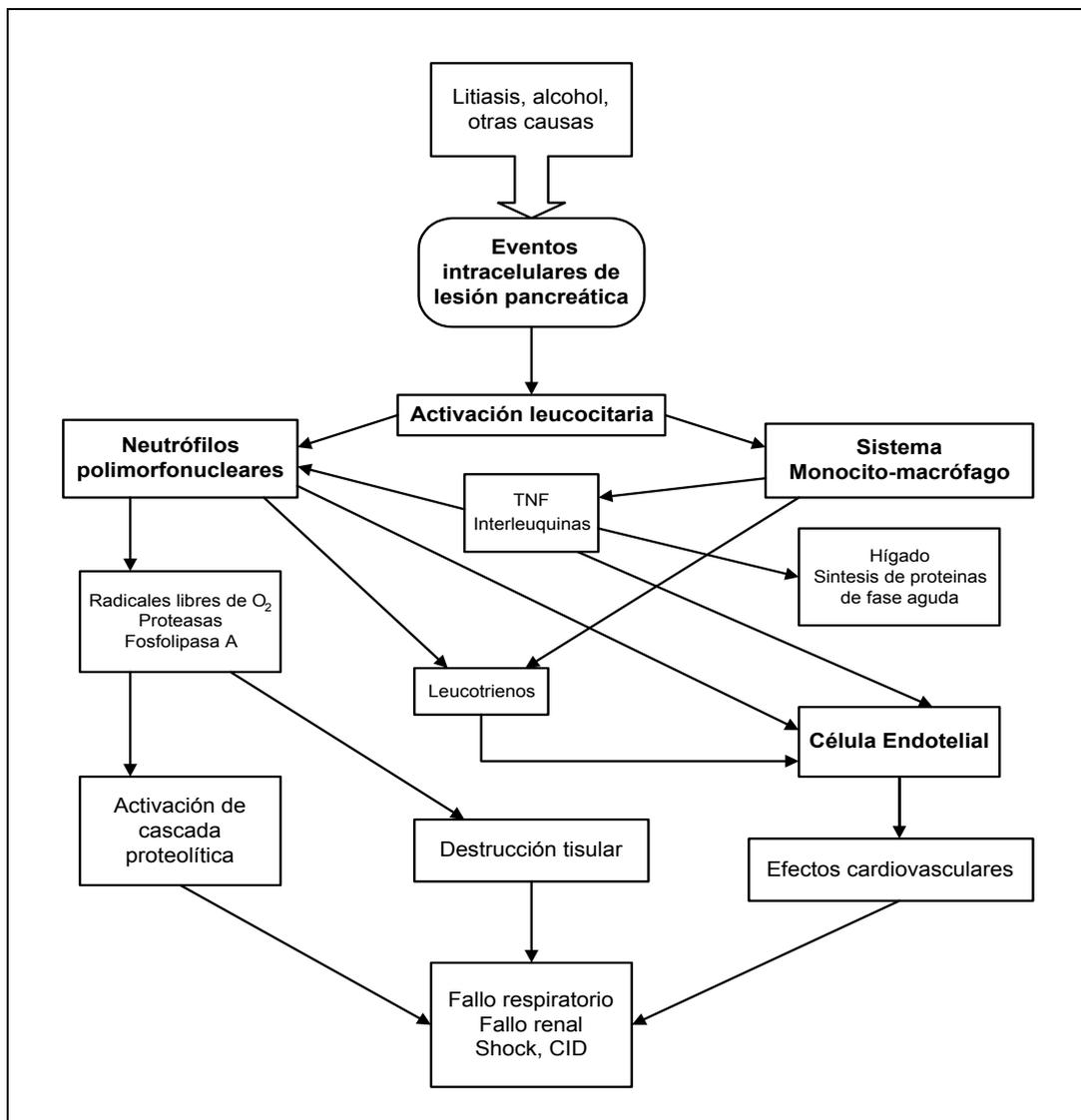


Figura 5. Mecanismos fisiopatológicos en la pancreatitis aguda grave.

El endotelio aparece como órgano diana de los mediadores proinflamatorios a nivel sistémico<sup>66,67</sup> y también como co-responsable de la aparición de efectos locales como el edema o necrosis pancreática por alteraciones de la microcirculación, sea en forma de vasoconstricción, aumento de la permeabilidad, coagulación intravascular o lesión directa de la pared vascular.

### **1.3 Efectos sistémicos de la pancreatitis aguda**

La pancreatitis aguda es una enfermedad potencialmente grave, con una mortalidad que oscila entre el 5 y el 15%, mantenida a pesar de las mejoras en el tratamiento y cuidados intensivos que se han apreciado en los últimos años<sup>68</sup>. La mortalidad viene determinada por las complicaciones locales y sistémicas, y se concentra en los casos graves de la enfermedad. El tratamiento de estos casos graves se fundamenta en el sustento de las funciones orgánicas y en la corrección de los desequilibrios hidroelectrolíticos y ácido-base. La mayoría de pacientes que fallecen en el curso de una pancreatitis lo hacen en la primera semana, a consecuencia de efectos sistémicos, sobre todo a nivel cardiovascular, respiratorio o renal. El resto de muertes se producen más adelante y su causa fundamental es la sepsis con infección del tejido pancreático necrótico. Los gérmenes alcanzan las zonas desvitalizadas peripancreáticas vía hematológica, linfática o mediante migración transmural a través de la pared intestinal. Este fenómeno, conocido como translocación bacteriana, se ve favorecido por la depresión del sistema inmunitario, el descenso de la motilidad intestinal y la consiguiente alteración de la flora intestinal que ocurren en la pancreatitis aguda<sup>69</sup>.

Las complicaciones de la pancreatitis aguda pueden presentarse aisladas o combinar la afectación de varios órganos.

### **1.3.1 Complicaciones y efectos órgano-específicos de la pancreatitis aguda**

#### **1.3.1.1 Shock y efectos cardio-vasculares**

El shock se consideraba clásicamente como una de las complicaciones más graves y frecuentes de la pancreatitis aguda. Dos factores contribuyen de forma importante a las alteraciones hemodinámicas en estos pacientes, la hipovolemia y la depresión miocárdica (figura 6). Ambos dan lugar a un patrón caracterizado por el aumento del índice cardíaco, la disminución de las resistencias periféricas, la redistribución del flujo con hipoperfusión esplácnica y aumento de las resistencias vasculares pulmonares<sup>70</sup>, similar a lo que ocurre en las fases tempranas del shock séptico.

El secuestro masivo de líquido intra y retroperitoneal, en el denominado “tercer espacio” puede provocar la pérdida de hasta el 40% del volumen plasmático. A esta pérdida de líquido exudado por el páncreas hay que añadir las pérdidas producidas por el aumento de permeabilidad capilar en toda la economía, las pérdidas producidas por vómitos y el íleo paralítico.

Existe la creencia de que las alteraciones de la función miocárdica, tales como el índice cardíaco aumentado, el índice de trabajo del ventrículo izquierdo disminuido o el aumento de la resistencia vascular pulmonar, no se acompañan de anomalías estructurales del corazón<sup>71</sup>. Durante la pancreatitis aguda está demostrada la activación del sistema de la kinina, que lleva a un aumento de las prostaglandinas y otras

substancias vasoactivas circulantes con potentes efectos cardiovasculares. Por otro lado, la existencia y liberación pancreática de factores depresores del miocardio es discutida<sup>72</sup>. Sin embargo, estudios experimentales realizados recientemente señalan alteraciones ultraestructurales en la célula miocárdica de animales sometidos a pancreatitis aguda, entre ellas un edema de las células miocárdicas, aumento de la longitud de los discos intercalares, aflojamiento de las bandas contráctiles y disrupción mitocondrial<sup>73</sup>.

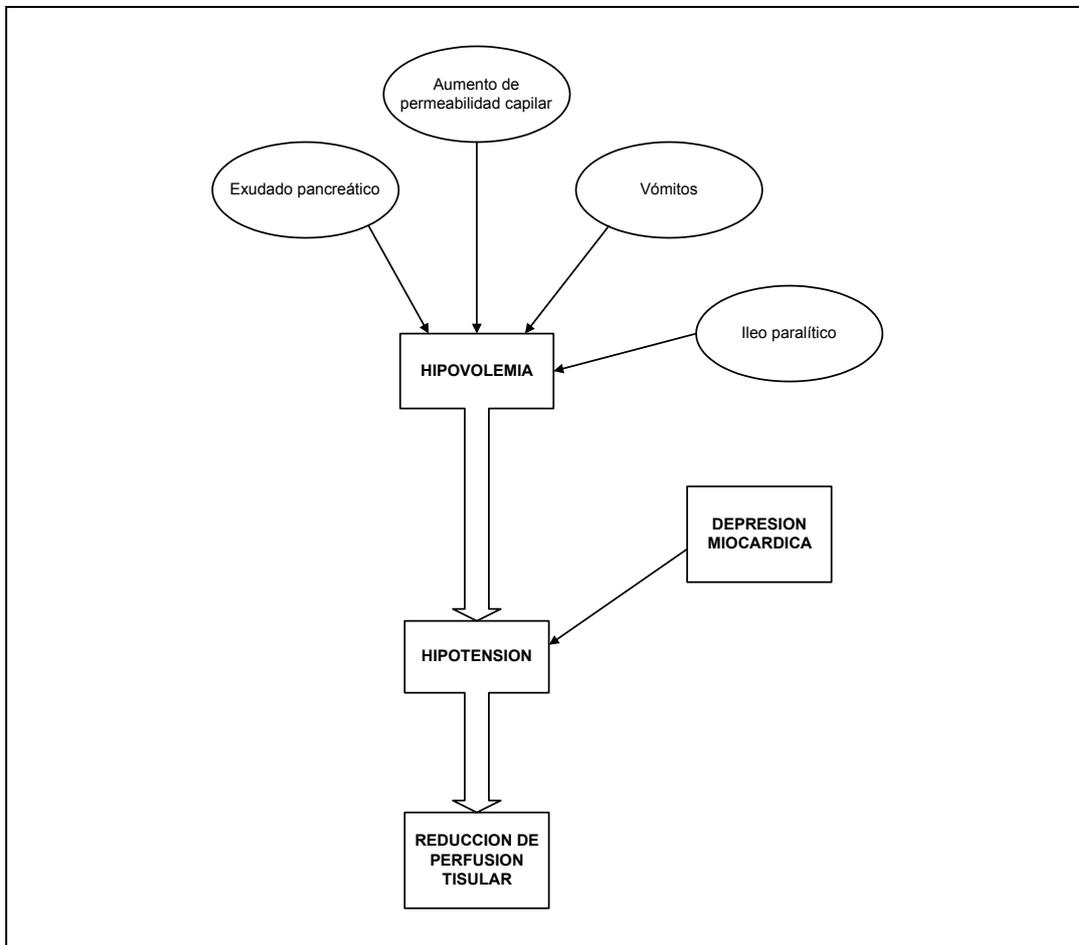


Figura 6. Factores que contribuyen al shock durante la pancreatitis aguda.

### 1.3.1.2 Efectos sobre el pulmón

La importancia de las complicaciones respiratorias en la pancreatitis aguda esta determinada por su frecuencia y gravedad. El

pulmón es el órgano extra-pancreático más frecuentemente afectado, con una incidencia que oscila entre el 15 y el 70%<sup>74,75</sup>. Además, el 60% de la mortalidad de la pancreatitis aguda durante la primera semana está asociada a la insuficiencia respiratoria.

La severidad de la afectación pulmonar varía desde una leve hipoxemia sin alteración clínica o radiológica hasta el síndrome del distrés respiratorio del adulto (SDRA). Entre sus causas destacan factores mecánicos como la elevación diafragmática, atelectasias o derrame pleural; alteraciones del intercambio gaseoso y de la perfusión pulmonar, con una permeabilidad capilar aumentada, edema pulmonar y shunt derecha-izquierda intrapulmonar; o alteraciones del surfactante.

Por su importancia en el presente estudio, las complicaciones pulmonares y su fisiopatología son tratadas más adelante con especial detenimiento.

### **1.3.1.3 Efectos sobre el riñón**

La insuficiencia renal es una complicación grave de la pancreatitis aguda cuya aparición representa una mortalidad cercana al 75% pese a la realización de medidas de soporte y hemodiálisis<sup>76</sup>. Su incidencia oscila entre el 4'4 y el 14% según las series retrospectivas analizadas<sup>76,77</sup> y generalmente se presenta asociada a otras comorbilidades en el contexto del fallo multiorgánico.

La hipovolemia y el shock son factores etiológicos de primer orden en el fallo renal asociado a la pancreatitis aguda, aunque existen otras anomalías renales intrínsecas, como la disminución del filtrado glomerular y el aumento de la excreción urinaria de sodio, que han sido

descritas incluso en pacientes con volemias normales<sup>78</sup>. La necrosis tubular aguda es la forma de presentación más común. En fases tardías de la pancreatitis la aparición de la disfunción renal se relaciona con complicaciones sépticas.

El mejor tratamiento de esta complicación es la prevención mediante la reposición agresiva de líquidos y la monitorización hemodinámica y de la diuresis. La utilización de diuréticos, la dopamina por su efecto vasodilatador renal y la hemodiálisis o hemofiltración son otras medidas terapéuticas a considerar en la insuficiencia renal establecida.

#### **1.3.1.4 Efectos sobre el intestino**

El hecho de que los microorganismos Gram negativos entéricos sean los responsables de la mayoría de infecciones de necrosis pancreáticas induce a pensar que el intestino es la principal fuente de infección y que la pérdida de la barrera intestinal y consiguiente translocación bacteriana tienen una relación directa con este proceso<sup>79</sup>. Estudios experimentales han demostrado la existencia de una severa perturbación del metabolismo energético a nivel intestinal tan solo una hora después de la inducción de una pancreatitis aguda<sup>80,81</sup>. Este fenómeno podría estar relacionado con alteraciones de la perfusión en la mucosa intestinal que condicionarían una hipomotilidad intestinal, un cambio en la flora indígena y una permeabilidad anormalmente alta del intestino al paso de gérmenes y macromoléculas como la endotoxina. Este último punto, además, implicaría directamente al intestino en la génesis del fallo multiorgánico asociado a pancreatitis<sup>82</sup>.

### **1.3.1.5 Efectos sobre el hígado**

Los síntomas de lesión hepática en la pancreatitis aguda son relativamente infrecuentes, pero la insuficiencia hepática puede acompañar a la necrosis pancreática en hasta el 25% de los casos. La agresión sobre el hígado se manifiesta como hipoalbuminemia, hipofibrinogenemia, aumento de las actividades aminotransferasa y lactato deshidrogenasa, e hiperbilirrubinemia no conjugada. La lesión hepática es un indicador clínico de severidad de la pancreatitis<sup>83</sup>.

A pesar de que diversos estudios experimentales han demostrado la asociación entre pancreatitis aguda y alteración de la biología hepática, el análisis histológico hepático en animales de experimentación sometidos a pancreatitis aguda no revela cambios excepto una discreta perihepatitis probablemente consecuencia del proceso inflamatorio vecinal pancreático y peritoneal<sup>84</sup>. Murr demostró una relación indirecta entre la elastasa pancreática e incrementos de los valores enzimáticos de transaminasas en cultivos de hepatocitos, a través de la activación de producción de citoquinas por parte de las células de Kupffer hepáticas. Por otro lado, la ascitis pancreática puede contribuir a lesionar el hepatocito durante la pancreatitis aguda, por la existencia en el líquido de ciertos mediadores (proteínquinas) que inducirían la apoptosis hepática<sup>85</sup>.

### **1.3.1.6 Alteraciones metabólicas asociadas a pancreatitis aguda**

Los trastornos electrolíticos y la alteración del metabolismo de la glucosa aparecen con frecuencia en la pancreatitis aguda. La hipocalcemia (< 8 mg/dl) aparece entre un 30 y un 60% de los pacientes y es un signo de mal pronóstico<sup>86</sup>. Los mecanismos de esta hipocalcemia

son controvertidos. Se ha sugerido que el calcio es secuestrado por las áreas de necrosis grasa sufriendo procesos de saponificación. Sin embargo, esta hipocalcemia raramente tiene una expresión clínica, debido a que los exudados pancreáticos, con alto contenido proteico, producen hipoalbuminemia. En la sangre, aproximadamente el 50% del calcio va unido a la albúmina, por lo que la hipoalbuminemia condiciona una hipocalcemia relativa, puesto que no se afecta la cifra de calcio iónico. La hiper glucagonemia y el aumento en la circulación de ácidos grasos libres se han asociado también con la hipocalcemia<sup>71</sup>. En estrecha relación con la hipocalcemia pueden producirse hipomagnesemia e hipofosfatemia. El tratamiento de los enfermos mediante la reposición de calcio raramente es necesario, y en todo caso, debe evitarse la infusión endovenosa rápida de calcio porque puede producir hipercalcemia y los consiguientes efectos negativos sobre el páncreas, incluyendo necrosis acinar y ductal<sup>87</sup>.

La hiperglicemia es otro signo de mal pronóstico en la pancreatitis aguda. Su aparición se relaciona con la destrucción de islotes pancreáticos, la elevación importante de los niveles de glucagón circulante, con disminución de los niveles de insulina y liberación de catecolaminas. La diabetes mellitus puede desarrollarse entre un 2 y un 10% de los pacientes. También pueden presentarse niveles elevados de hormona del crecimiento y cortisol.

La hiperlipidemia se presenta en un 20% de los pacientes y puede ser causa o efecto de la pancreatitis aguda. Puede presentarse hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Su significado clínico viene representado por su alta incidencia en pacientes con SDRA, la

normalización artefactada de la amilasemia y la posible aglutinación de partículas lipídicas séricas y embolia grasa secundaria<sup>71</sup>.

### **1.3.1.7 Otros efectos de la pancreatitis aguda**

Durante la pancreatitis aguda grave pueden ocurrir alteraciones de la coagulación, desde niveles subclínicos con aumento de los niveles de productos de degradación del fibrinógeno (PDF), hipofibrinogenemia, reducción del recuento plaquetar y caída del tiempo de protrombina, hasta fenómenos de coagulación intravascular diseminada (CID). El mecanismo de estas alteraciones no está claro, habiéndose sugerido como factores responsables la tripsina, el equilibrio proteasa-antiproteasa o la alteración del sistema retículo-endotelial. La CID se ha relacionado con descenso en los niveles de antitrombina III, el principal inhibidor de la trombina, pero también inhibidor de los factores de la coagulación IX, X, XI y XII, del plasminógeno, del factor tisular, de la calicreina y de la tripsina<sup>88</sup>.

La encefalopatía pancreática, caracterizada por desorientación, confusión agitación y alucinaciones fue descrita por Rothermich y von Hamm<sup>89</sup>. Inicialmente se relacionó con el consumo de alcohol, si bien se han comprobado niveles elevados de enzimas pancreáticas como la fosfolipasa A en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes. También podría estar relacionada con la hipoxemia o alteraciones del calcio y del magnesio. Las lesiones cerebrales semejan las placas de la esclerosis múltiple al estudiarlas mediante resonancia magnética<sup>90</sup>.

La retinopatía angiopática asociada a la pancreatitis aguda, conocida como retinopatía de Purtscher, fue descrita en 1975 y se caracteriza por una pérdida brusca de visión, observándose en el estudio

del fondo de ojo unas manchas blanquecinas de aspecto algodonoso y hemorragias laminares entre la mácula y el disco óptico que representan edema de retina e infarto del nervio óptico<sup>91,92</sup>.

Los efectos sistémicos de la pancreatitis aguda también afectan al tejido graso celular subcutáneo y a las articulaciones. La necrosis grasa provocada por la lipasa forma nódulos subcutáneos blandos y rojizos a nivel de nalgas, brazos y tórax, descritos por Chiari en 1883 y cuya biopsia presenta células basófilas<sup>93</sup>. En la medula ósea pueden aparecer lesiones osteolíticas por la necrosis grasa intramedular. La pancreatitis se ha asociado a artritis y sinovitis que afectan articulaciones metatarsales, interfalángicas, rodillas, tobillos y muñecas. En estos pacientes se ha descrito eosinofilia, niveles disminuidos de complemento y niveles elevados de prostaglandina E (PGE) en líquido sinovial<sup>94</sup>.

#### **1.3.1.8 Fallo multiorgánico**

El fallo multiorgánico (FMO) es un estado hipercatabólico que constituye la primera causa de estancia prolongada y de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos. Se define como la presencia simultánea de insuficiencia en al menos 3 órganos de la economía y representa las alteraciones fisiológicas consecuencia de la respuesta inflamatoria a diferentes estímulos. Su aparición en la pancreatitis aguda se cifra entre un 5 y 27% de los pacientes, hallándose íntimamente ligado a la necrosis pancreática<sup>95</sup>. Es la complicación más grave en el curso de una pancreatitis y su mortalidad alcanza el 86% en algunas series. La existencia de cuatro o más órganos afectados se asocia a una mortalidad del 100%<sup>96</sup>

Clínicamente, en un primer momento aparecen aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria, aumento de la temperatura corporal y del recuento leucocitario, con alteraciones del estado mental. Más adelante se observa hipoxia, hipocapnia y hallazgos radiológicos compatibles con el SDRA. Tras esta fase se establece una reacción en cascada, representada por un empeoramiento de la encefalopatía, acompañada de fallo respiratorio progresivo y fallo renal con necrosis tubular aguda. Además pueden desarrollarse una hemorragia digestiva alta, bacteriemias polimicrobianas, malnutrición y finalmente coagulopatías, alteraciones dérmicas y fallo hepático, camino final común del FMO.

En la pancreatitis aguda se han identificado dos patrones de FMO. Por un lado, en una fase inicial de la enfermedad el páncreas es capaz de liberar múltiples y potentes péptidos vasoactivos, enzimas y hormonas que desencadenan el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). Por otro lado, en una fase más tardía, la infección y sepsis pancreática pueden también desencadenar este síndrome<sup>97</sup>.

El FMO se halla al final de la secuencia de diferentes eventos patológicos (infección, politraumatismo, estrés quirúrgico, pancreatitis o grandes quemados), como se aprecia en la figura 7. Estos insultos iniciales desencadenan una respuesta en el organismo por parte de mediadores celulares y humorales que provocan cambios ultraestructurales en diferentes órganos, pero sin afectar a su función. En esta

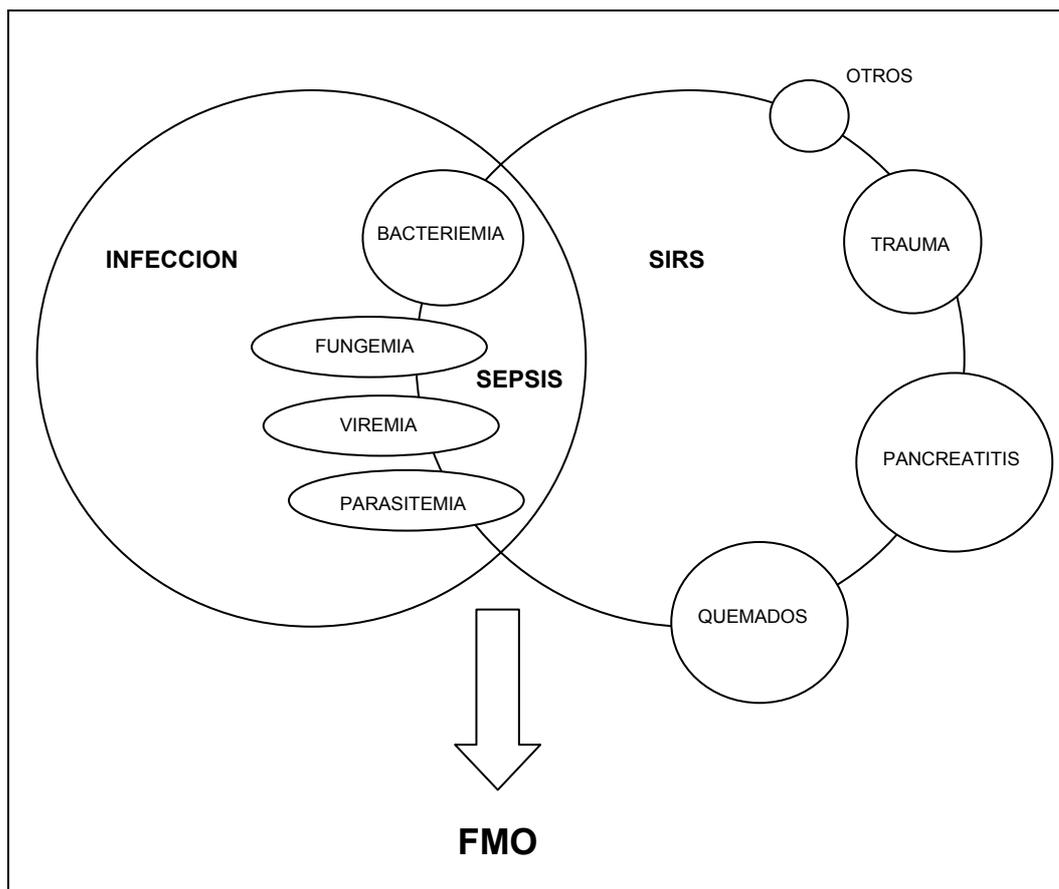


Figura 7. Condiciones asociadas a la respuesta inflamatoria sistémica.

fase el daño orgánico es en parte reversible con la detección y el tratamiento precoz. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria no se detiene aparece el SRIS, consecuencia de la potenciación de reacciones en cadena de mediadores proinflamatorios que provocan alteraciones de la microcirculación, lesión de células endoteliales y aparición de metabolitos tóxicos<sup>73</sup>, que provocarán una mayor lesión orgánica con alteración funcional (figura 8). En la actualidad existen líneas de investigación terapéutica en diversos países que intentan bloquear las reacciones inflamatorias mediante la acción de anticuerpos monoclonales o sustancias inhibidoras<sup>62</sup>. Sin embargo, hasta la fecha se ha observado que con el bloqueo de un único mediador no se puede controlar la cascada inflamatoria.

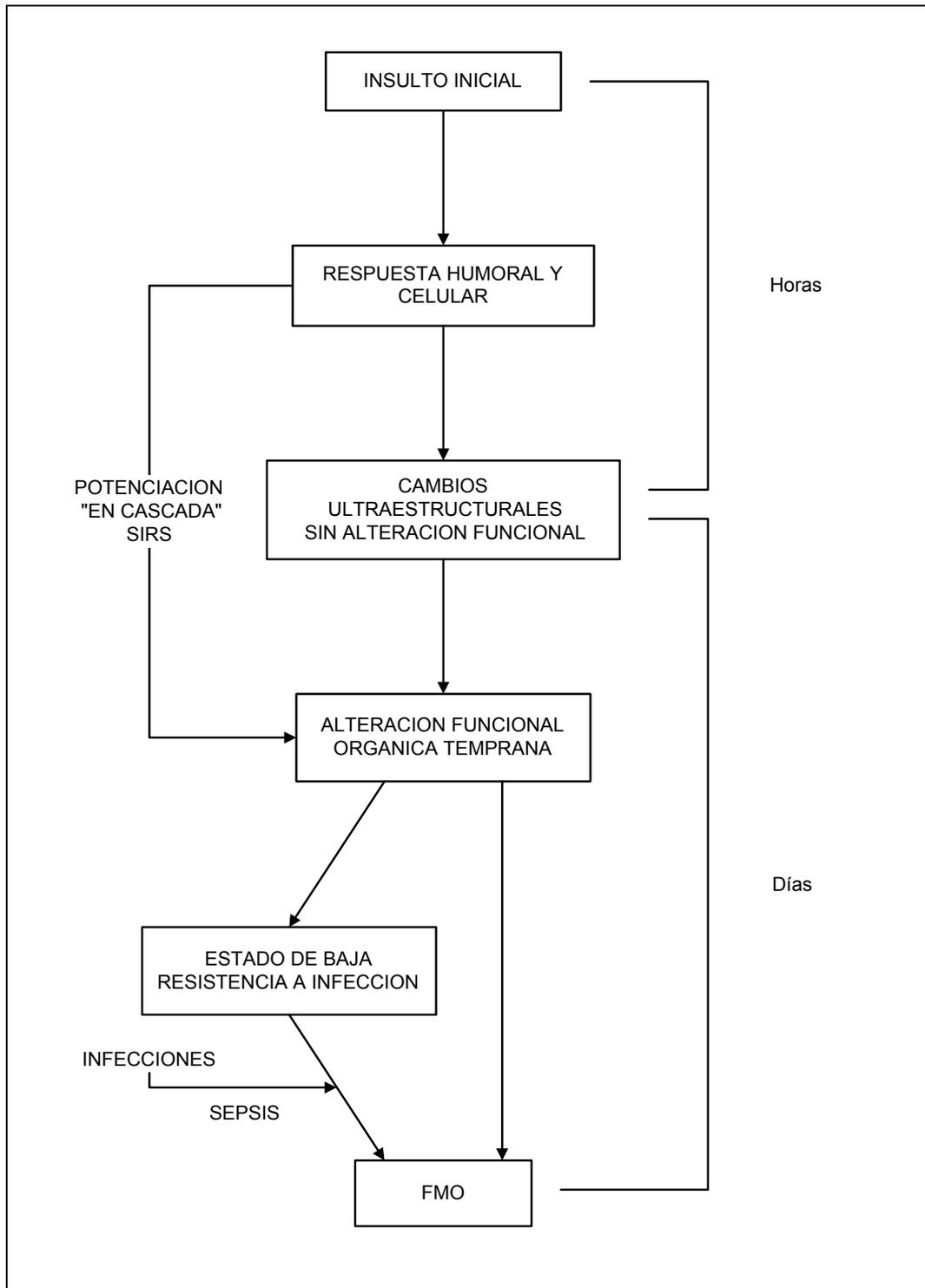


Figura 8. Secuencia de eventos en el fallo multiorgánico.

La presentación del SRIS conlleva la aparición de un síndrome de respuesta compensadora anti-inflamatoria (SRCA) y la homeostasis del cuerpo depende del balance entre ambos<sup>98</sup>. En el peor de los casos la respuesta clínica a una agresión tiene como resultado final el FMO al no

poder ser mantenida la homeostasis corporal sin medidas de soporte activas y se manifiesta por dos o más de las siguientes condiciones:

- Temperatura  $> 38^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$ .
- Frecuencia cardíaca  $> 90$  pulsaciones por minuto.
- Frecuencia respiratoria  $> 20$  por minuto o  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg.
- Leucocitosis  $> 12.000$  células/ml,  $< 4.000$  células/ml o  $> 10\%$  de células inmaduras.

La alteración funcional orgánica provocada por el SRIS produce un estado de baja resistencia a infecciones. La aparición de gérmenes, bien sea por fenómenos de translocación bacteriana o infecciones nosocomiales, introduce el concepto de sepsis, cuadro clínico de otro modo indistinguible del propio SRIS. En la pancreatitis aguda estas situaciones pueden yuxtaponerse. Estudios experimentales demuestran que la infección intra-abdominal puede producir una progresión al FMO de un modo similar a la pancreatitis aguda. De hecho, en ambos procesos es la respuesta inflamatoria del huésped la que determina el pronóstico, mediadores celulares como los monocitos o las células endoteliales juegan un importante papel en el inicio y mantenimiento de dicha respuesta y en ambos procesos existe similitud en los mecanismos de lesión a distancia<sup>65</sup>.

## **1.3.2 Medidores de la inflamación implicados en los efectos sistémicos de la pancreatitis aguda**

### **1.3.2.1 Componente celular**

#### *1.3.2.1.1 Sistema monocito-macrófago*

El sistema monocito-macrófago (m-M) está constituido por los monocitos en sangre periférica y los macrófagos en diferentes tejidos. Todas las células del sistema m-M tienen su origen en la médula ósea. Durante el proceso de hematopoyesis las células progenitoras dan lugar a promonocitos, que salen al torrente circulatorio donde se diferencian a monocitos maduros. Posteriormente emigran a los tejidos donde se convierten en macrófagos. La transformación de monocito a macrófago comprende varias etapas: las células aumentan de tamaño entre 5 y 10 veces, sus organelas intracitoplasmáticas crecen en número y complejidad, adquieren capacidad de fagocitación, producen gran cantidad de enzimas, factores solubles y mediadores. Los macrófagos se encuentran en todos los órganos y tejidos, recibiendo nombres especiales para designar localizaciones concretas: en hígado se denominan células de Kupffer, en el tejido conectivo histiocitos, en el cerebro microglía, en el riñón células mesangiales y en el pulmón macrófagos alveolares.

Los macrófagos centran sus funciones en la defensa del organismo, mediante la fagocitosis de partículas extrañas como microorganismos, macromoléculas, e incluso tejidos propios lesionados o muertos. Las sustancias fagocitadas son degradadas en su interior mediante enzimas lisosomales. Así mismo los macrófagos son capaces

de secretar otras enzimas, radicales libres de oxígeno, óxido nítrico citoquinas y mediadores lipídicos, sustancias todas ellas capaces de actuar frente a agentes extraños. Los macrófagos también muestran en su superficie determinados antígenos extraños, de forma que pueden ser reconocidos por los linfocitos T específicos, actuando como células presentadoras de antígenos para favorecer la activación linfocitaria<sup>99</sup>.

Los macrófagos se encuentran normalmente en estado de reposo, pero se activan con rapidez frente a estímulos diversos como la fagocitación de determinados antígenos, mediadores secretados por linfocitos T<sub>H</sub> o elementos de la pared bacteriana. Una vez activados inician la producción de mediadores proteicos, radicales libres de oxígeno y derivados lipídicos, incrementando su capacidad fagocítica y quimiotáctica, su capacidad antibacteriana y citotóxica, desencadenando una secreción en cascada de citoquinas y mediadores de la inflamación<sup>100</sup>. La activación de los macrófagos parece estar regulada, a su vez, por citoquinas y mediadores de la inflamación. El factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF), molécula descrita en 1966 como una citoquina derivada de los linfocitos T activos que prevenía la migración al azar de los macrófagos, es una importante citoquina proinflamatoria secretada por múltiples tipos celulares en respuesta a infección o estrés. Actualmente se conoce que el sistema m-M, originariamente considerado objetivo del MIF, es un importante productor de esta citoquina tras exposición a endo y exotoxinas. Una vez liberado, el MIF induce la expresión de mediadores por los macrófagos y células T activas, estimulando la respuesta inflamatoria e inmune<sup>101</sup>.

Los macrófagos son capaces de secretar más de 100 sustancias diferentes, con pesos moleculares que oscilan entre 32 (óxido nítrico) y 440.000 (fibronectina), y cuya actividad biológica es muy variable, desde la inducción del crecimiento celular a la citotoxicidad (figura 9). Un aspecto importante es la rapidez de acción de los macrófagos, que de forma casi inmediata tras el estímulo aumentan la síntesis de mRNA y la secreción de sustancias alcanza un pico en pocas horas<sup>102</sup>.

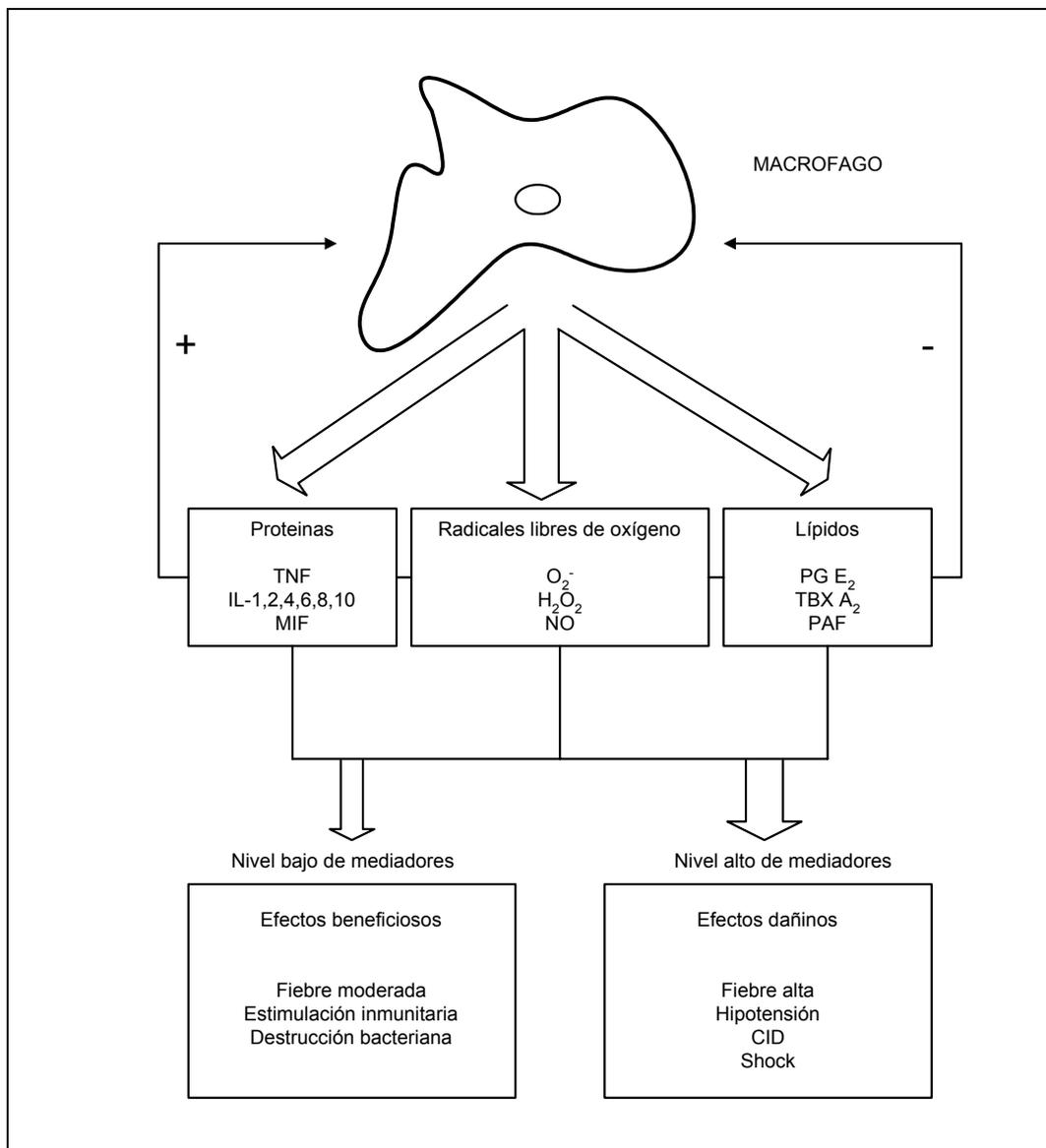


Figura 9. Producción de mediadores y efectos tras la activación de macrófagos.

La producción de citoquinas por los macrófagos forma parte de un complejo entramado defensivo que protege al organismo de invasión por agentes infecciosos o lesiones hícticas y que la mayor parte de las veces consigue restituir la integridad tisular. Sin embargo, otras veces, la sobreproducción o alteración en la regulación tiene efectos perjudiciales, como sucede en estados de endotoxemia, tras la isquemia-reperfusión, el FMO o el SDRA<sup>103</sup>.

Hoy en día existen evidencias de que los macrófagos intervienen en las fases iniciales de la pancreatitis aguda y tienen un papel en el mecanismo de producción de lesiones a distancia<sup>104,105</sup>. Estudios mediante determinación de mRNA e inmunohistoquímica indican que son los macrófagos activados a nivel del páncreas los que primero inician la síntesis de mediadores, especialmente IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , como respuesta a la lesión tisular<sup>106,107</sup>. La presencia de grandes cantidades de estos mediadores, o su persistencia durante largos periodos temporales, condiciona la respuesta sistémica. La observación de que existe una diferencia temporal entre la producción de citoquinas a nivel del páncreas y otros órganos es importante. Por otro lado, el hecho de que las citoquinas se produzcan en pulmón, hígado y bazo en niveles muy superiores al suero, y que así mismo no se produzcan en otros órganos como riñones, corazón o cerebro sugiere que pueden ser los macrófagos tisulares, más que las células circulantes, la mayor fuente de citoquinas<sup>108</sup>.

Las **células de Kupffer** en el hígado constituyen la población más extensa de macrófagos tisulares, se sitúan entre la circulación portal y

sistémica y presentan dos funciones importantes, su actividad fagocitaria y ser las principales productoras de citoquinas como IL-1 o  $\text{TNF}\alpha$ <sup>109</sup>. Ello ha sido demostrado en estudios experimentales sobre isquemia-reperfusión<sup>110</sup> e inducción por endotoxinas<sup>111</sup>. En la pancreatitis aguda, la ausencia de un infiltrado polimorfonuclear a nivel hepático, combinado con la ausencia de cambios en las enzimas de histolisis que implicaría a los hepatocitos, sugieren también a este tipo celular como el más importante productor hepático de citoquinas<sup>112</sup>. Las células de Kupffer son estimuladas en una forma dosis dependiente por los mediadores que alcanzan el hígado a través de la vena porta, procedentes del páncreas<sup>113</sup>. Entre ellos está la elastasa pancreática, que induce la producción de TNF por las células de Kupffer mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>114</sup>. Otra evidencia a favor de la participación de las células de Kupffer en la respuesta sistémica a la pancreatitis es el hecho de que al bloquear la célula mediante cloruro de gadolinio, se provoca un descenso del gradiente de citoquinas entre la vena porta y la hepática y una disminución de la respuesta sistémica en animales de experimentación<sup>115</sup>.

A nivel pulmonar las principales células del sistema m-M son los **macrófagos alveolares**. Estas células constituyen la primera línea defensiva frente a la infección pulmonar. Presentan pseudópodos lameliformes e inclusiones lisosómicas en su membrana, que es rica en receptores del complemento, receptores de inmunoglobulinas y para citoquinas. La destrucción de elementos extraños la realiza mediante su sistema fagolisosomal y la generación de hidrolasas, prostaglandinas,

componentes del complemento e iones superóxido que mantienen la superficie alveolar estéril. Cuando estos macrófagos son estimulados por los productos metabólicos de las bacterias liberan factores quimiotácticos y citoquinas que inducen la migración transendotelial de leucocitos polimorfonucleares<sup>116</sup>. Los macrófagos alveolares son las células más numerosas del pulmón y son constantemente eliminados y substituidos. La capacidad de los macrófagos alveolares para movilizar grandes cantidades de leucocitos y de segregar numerosos mediadores inflamatorios sugieren que esta célula tiene un papel importante en la lesión tisular pulmonar<sup>117</sup>.

#### *1.3.2.1.2 Neutrófilos*

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) son los granulocitos más numerosos y la principal población celular en la respuesta inflamatoria aguda. Poseen un núcleo multilobulado, son producidos por la médula ósea y pasan a la circulación periférica, donde permanecen entre 7 y 10 horas antes de migrar a los tejidos. Allí su vida media es de tres días.

Los neutrófilos responden con rapidez a estímulos quimiotácticos y citoquinas, y poseen receptores para IgG y para proteínas del complemento. Existen dos factores que se creen fundamentales para la activación de los neutrófilos y en particular para la transducción de señales agonistas quimiotácticas: una elevación en el  $\text{Ca}^{2+}$  libre citoplasmático y la activación de la proteínquinasa C<sup>118</sup>. Tras su activación, estas células acuden a los focos de inflamación y/o infección para ejercer su acción defensiva. Como los macrófagos, los leucocitos

PMN son activas células fagocíticas. Así mismo poseen gránulos primarios o azurófilos, un tipo particular de lisosomas que contienen peroxidasa, lisozima y enzimas hidrolíticas, y secundarios que contienen colagenasa, elastasa, lactoferrina y catepsinas. Además de estos mecanismos de defensa derivados de los gránulos intracelulares, los neutrófilos poseen otros sistemas asociados con su membrana celular que los hacen ser grandes productores de radicales libres de oxígeno<sup>119</sup>. Esta gran capacidad defensiva frente a microorganismos también conlleva una mayor agresividad para los propios tejidos cuando se produce la disfunción de su control. Ello les ha implicado en diversos procesos patológicos como el SDRA, la pancreatitis aguda y el shock séptico<sup>118,120</sup>.

La participación de los neutrófilos en la pancreatitis aguda se ha evidenciado tanto por estudios morfológicos como por la presencia de productos de estas células en la glándula afectada y en el plasma de los pacientes. El enzima proteolítico más abundante en los neutrófilos es la elastasa, que posee una extraordinaria capacidad destructiva, ya que degrada prácticamente todos los componentes de la matriz extracelular, tanto de las células invasoras como de las propias sanas del organismo. Esta enzima, una vez liberada se une a la  $\alpha$ -1-antitripsina, considerándose que este complejo es un marcador específico de la activación del neutrófilo y se halla más elevado en el suero de los pacientes con formas graves de la enfermedad<sup>121</sup>. La elastasa produce la fragmentación de varias proteínas plasmáticas clave como factores de la coagulación, complemento e inmunoglobulinas, y participa de forma activa en la lesión de la célula endotelial mediada por neutrófilos<sup>54</sup>. Además de

esta actividad proteolítica, la elastasa posee efecto quimiotáctico, induce la expresión génica de citoquinas, factores de crecimiento y otras sustancias. La migración de leucocitos PMN al páncreas es probablemente un evento crítico en el curso de la pancreatitis aguda grave. Este flujo de leucocitos se ha demostrado mediante técnicas de escintigrafía<sup>122</sup>. Algunos autores han abortado la lesión pancreática y sus complicaciones sistémicas de forma experimental, tanto mediante la depleción sanguínea de leucocitos PMN como con la utilización de antioxidantes<sup>75,123</sup>. Sin embargo, los factores que inducen la activación de los neutrófilos son motivo de controversia y no se conoce si se trata simplemente de la cantidad de necrosis pancreática, de los productos de una infección bacteriana o de la presencia de otros potentes factores quimiotácticos<sup>54</sup>. La inhibición de las enzimas pancreáticas en la luz intestinal previene la mortalidad en animales con estados de shock<sup>124</sup>. Esta evidencia lleva a la hipótesis de que podrían ser las enzimas pancreáticas las que inician la formación de mediadores<sup>53</sup>.

En el pulmón, los neutrófilos se consideran en parte responsables de la lesión a distancia provocada por la pancreatitis aguda. Tras la activación de los macrófagos intersticiales y alveolares se libera IL-8, una potente citoquina activadora de neutrófilos, así como otros factores (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) que conducen al secuestro y activación de los PMN. En la sepsis, la endotoxina liberada por bacterias gram negativas es capaz de generar infiltración pulmonar por neutrófilos, bien sea de forma directa o por la activación de macrófagos o complemento, y en último término provocar un SDRA. De todo ello la literatura aporta abundante evidencia

experimental y clínica<sup>125-128</sup>, si bien existen puntos de controversia como el papel de los factores de complemento<sup>75,129</sup>. Los neutrófilos pueden causar lesiones en las células alveolares y endoteliales mediante acción directa de enzimas o por radicales libres de oxígeno. En un modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína, los neutrófilos se han identificado como la fuente más importante de radicales libres de oxígeno<sup>130</sup>. Por otra parte la elastasa puede destruir proteínas específicas del surfactante pulmonar, alterando su función e interfiriendo el intercambio gaseoso. Todo ello contribuye a la patogénesis del SDRA. Los mecanismos de activación y acción de los neutrófilos se ilustran en la figura 10.

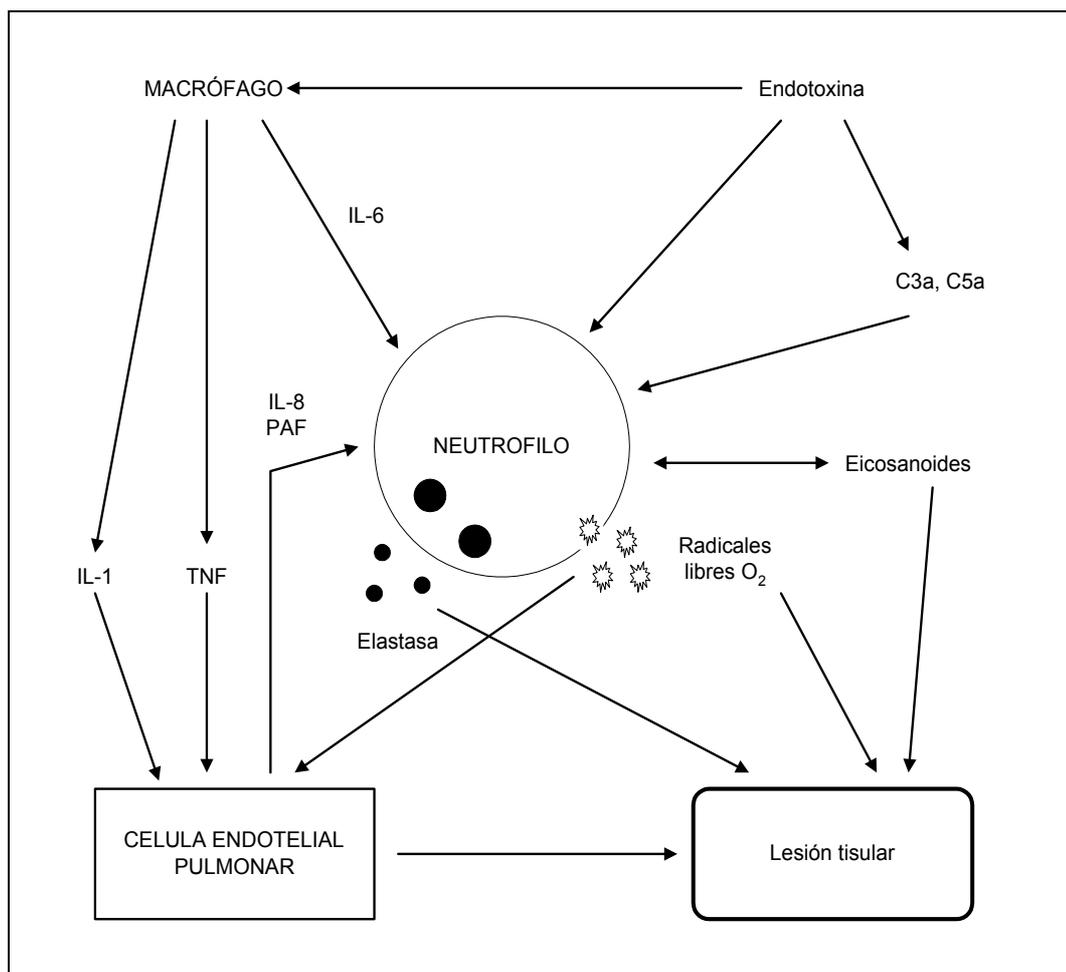


Figura 10. Mecanismos de activación y acción de los neutrófilos.

### 1.3.2.1.3 Célula endotelial

El endotelio vascular está compuesto por células aplanadas y poligonales de núcleo plano unidas entre sí. La célula endotelial tiene un importante papel en el movimiento pasivo de agua y electrolitos del medio intravascular al extravascular y viceversa, pero también tiene una función en el transporte activo de sustancias, como lo demuestran las numerosas vesículas de pinocitosis presentes en ella. Además, la presencia de uniones cerradas entre las células endoteliales justifica que el paso de materiales se efectúe a través de las células.

El endotelio juega un importante papel en la formación de una barrera efectiva contra la infiltración por células del sistema inflamatorio<sup>131</sup>. Las células endoteliales constituyen la primera barrera entre la sangre y el espacio extravascular, manteniendo la integridad estructural y funcional de la circulación y contribuyendo al balance local de mediadores pro y antiinflamatorios. La estimulación o la malfunción de estas células provoca la sobre expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos y promoviendo la respuesta inflamatoria mediante la liberación de múltiples sustancias mediadoras. La interacción entre la célula endotelial y los neutrófilos lleva a un tráfico excesivo de neutrófilos a los tejidos y posterior activación de los mismos<sup>132</sup>. La participación de la célula endotelial en la activación y mantenimiento de la cascada inflamatoria las ha convertido en objetivo terapéutico ante los estados iniciales del FMO<sup>65</sup>.

El papel del endotelio en la pancreatitis aguda aún no ha sido del todo aclarado y ello se debe en parte a la relativa inaccesibilidad de la

célula endotelial y la escasez de marcadores específicos de activación endotelial<sup>133</sup>. Las selectinas son una familia de moléculas de adhesión que participan de forma activa en los procesos de marginación y adhesión leucocitaria. Se ha demostrado la presencia de P- y E-selectinas en la superficie de la célula endotelial activada tras un estímulo inflamatorio<sup>134</sup>. La interacción entre los leucocitos PMN y las células endoteliales se describe en la figura 11.

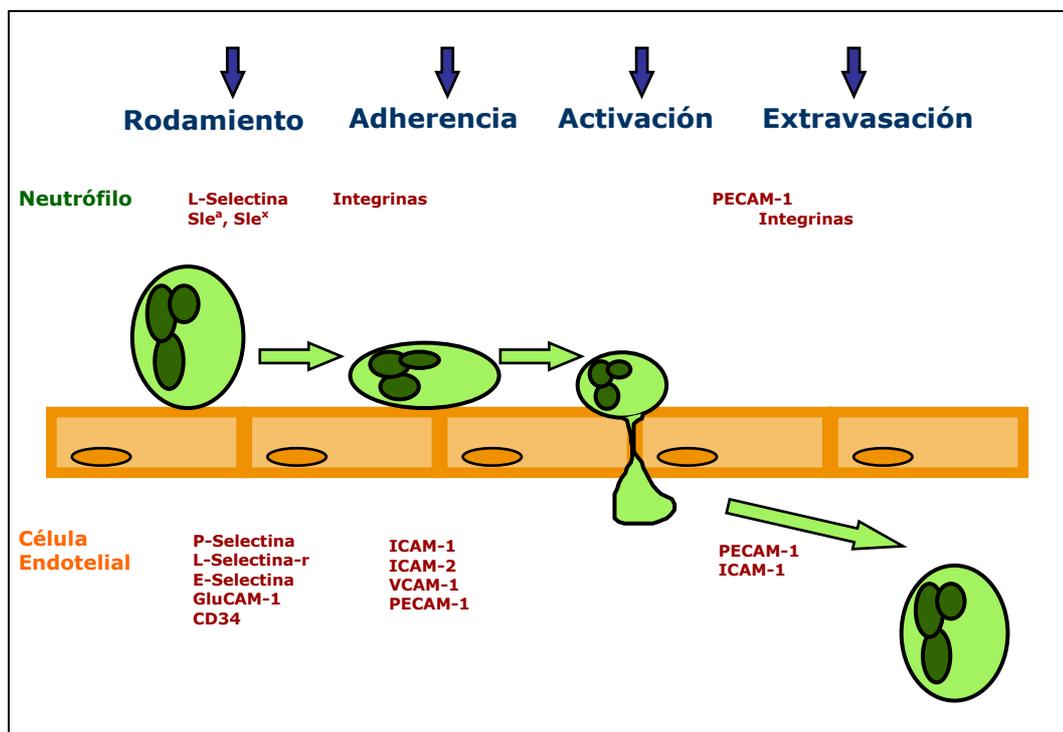


Figura 11. Fases de la interacción entre neutrófilos y células endoteliales.

El proceso puede dividirse en distintas fases: 1) rodamiento, enlentecimiento y marginación de los neutrófilos circulantes hacia la pared vascular, estableciéndose uniones laxas entre ambas células; 2) adherencia, con la participación de integrinas<sup>135</sup>; 3) activación, con la participación activa de factores como la IL-8 y PAF; y 4) trans migración o extravasación, proceso que depende de un gradiente quimiotáctico mediado por sustancias como la IL-8 o PECAM-1<sup>136</sup>.

En la pancreatitis aguda, el mecanismo regulador de las moléculas de adhesión parece estar mediado por los radicales libres de oxígeno más que ser dependiente de citoquinas, ya que la respuesta de éstas tarda de 3 a 4 horas<sup>137</sup> y estudios experimentales han demostrado que tras la inducción de una pancreatitis aguda experimental ocurre, de forma precoz, un aumento en la permeabilidad de la barrera endotelial, que persiste hasta 9 horas<sup>65</sup>. Estas modificaciones de la función de la célula endotelial participan de las alteraciones de la microcirculación reconocidas en la pancreatitis aguda, tanto a nivel local como en otros órganos, como el colon, hígado y pulmones, contribuyendo a la afectación sistémica de la enfermedad. Tras la lesión pancreática, las proteasas activas son secretadas al retroperitoneo, abdomen y circulación general donde dañarán de forma directa los tejidos, incluyendo el endotelio vascular y activarán el complemento y otras citoquinas inflamatorias. Esto incluye la activación de mediadores secundarios como la bradicinina, el factor activador plaquetario (PAF), óxido nítrico y endotelina, que exhiben varios efectos sobre la vascularización que afectan el flujo sanguíneo y la permeabilidad capilar y la interacción con leucocitos<sup>138</sup>. El grado en que estos mediadores alcanzan la circulación se correlaciona con la severidad de la enfermedad. La endotelina-1, molécula que se expresa principalmente en el endotelio, reduce el flujo pancreático y puede causar una necrosis acinar focal, similar a la objetivada en la pancreatitis aguda<sup>139</sup>. Esta molécula se halla elevada en plasma durante la pancreatitis aguda grave, no siendo así en formas leves de la enfermedad<sup>140</sup>. Recientes estudios experimentales con antagonistas de

estos mediadores vasoactivos han mejorado la supervivencia en la pancreatitis aguda grave experimental<sup>141</sup>.

### **1.3.2.2 Componente humoral**

#### *1.3.2.2.1 Radicales libres de oxígeno*

La molécula de oxígeno ofrece las ventajas de una producción eficiente de energía en todos los animales y plantas. Las células anaerobias obtienen su energía a partir de la fermentación de la glucosa. Esta fermentación no requiere oxígeno y tiene un rendimiento energético de 2 moléculas de ATP. El oxígeno permitió evolucionar a la cadena de transporte mitocondrial, lo que conllevó continuar el desdoblamiento de la glucosa hasta obtener, a partir de una sola molécula 30 moléculas de ATP, es decir un rendimiento 15 veces superior a la fermentación anaeróbica. Por otra parte, el oxígeno impone limitaciones asociadas a su elevada toxicidad. Así, muchas plantas crecen mejor en concentraciones de oxígeno inferiores a las normales; el crecimiento bacteriano puede inhibirse exponiendo el cultivo a altas concentraciones de oxígeno; y en animales superiores la exposición a altas concentraciones de oxígeno provoca toxicidad aguda en el sistema nervioso central.

La primera explicación de la toxicidad del oxígeno fue por inhibición de los enzimas celulares. Sin embargo este mecanismo es demasiado simple y específico para explicar todos los casos de toxicidad. En 1954, Gershman y Gilbert propusieron que la toxicidad del oxígeno se podía atribuir a la formación de radicales libres (RLO)<sup>142</sup>.

Los radicales libres son moléculas, átomos o iones que poseen uno o más electrones desemparejados, que les permiten captar o ceder electrones, lo que les confiere una alta reactividad<sup>143</sup>.

En el caso del oxígeno, durante la respiración mitocondrial normal, cada molécula de oxígeno acepta simultáneamente cuatro electrones mientras está unida a la *citocromo oxidasa*. Con esto se consigue reducir el oxígeno a agua evitando la liberación de intermediarios del oxígeno con electrones desemparejados. La reducción tetravalente del oxígeno se muestra en la figura 12. Si la transferencia de electrones no es simultánea sino consecutiva, aparecen los RLO.

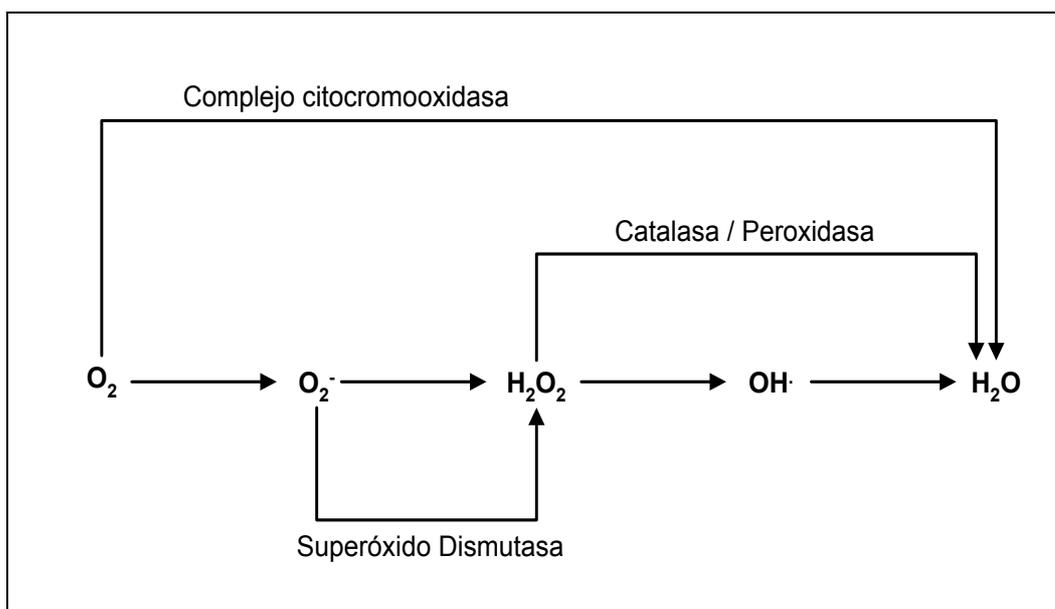
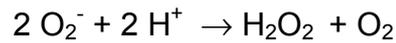


Figura 12. Reducción tetravalente del oxígeno.

El oxígeno molecular puede aceptar un electrón, formando el **radical superóxido** ( $O_2^-$ ). La interacción entre dos radicales superóxidos es una reacción rápida a pH neutro y puede ocurrir de forma espontánea o catalizada por la *superóxido dismutasa* (SOD) conduciendo a la formación del **peróxido de hidrógeno** ( $H_2O_2$ ). La reacción que tiene lugar es:



La interacción, mediada por el hierro, entre el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido da lugar al **radical hidroxilo** ( $\text{OH}^\cdot$ ) mediante la reacción de Haber-Weis:



El radical hidroxilo también puede generarse por la interacción directa entre el peróxido de hidrógeno con iones hierro ( $\text{Fe}^{++}$ ), o reacción de Fenton:



Dado que la SOD y el hierro se hallan en abundancia en los sistemas biológicos, estas reacciones tienen lugar de forma simultánea y en consecuencia, la formación del radical superóxido comporta la producción de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo.

La toxicidad de los RLO se asocia a su alta reactividad y al hecho de que la reacción de un radical libre con un no-radical produce un radical libre diferente, más o menos reactivo que el original. Los RLO, moléculas de vida corta y radio de acción limitado, originan cadenas de reacciones que extienden el daño considerablemente. Las membranas lipídicas son especialmente sensibles a los procesos de peroxidación, ello puede provocar la disrupción de lisosomas, mitocondrias y otras organelas intracelulares. El radical hidroxilo es particularmente agresivo, ya que presenta alta reactividad con prácticamente todos los tipos moleculares presentes en las células vivas como azúcares, aminoácidos, fosfolípidos o nucleótidos. El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido presentan una menor reactividad y su toxicidad puede ser directa o deberse al hecho

de que acaben produciendo radicales hidroxilo. La lesión sobre la membrana la pueden efectuar a través de uniones covalentes a enzimas y/o receptores de membrana, alterando su estructura y modificando su actividad o carácter antigénico, alterando los mecanismos de transporte por oxidación de los grupos tiol de los transportadores, y pueden además desencadenar procesos de lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados, afectando directamente las propiedades físicas de la membrana y depleccionando los ácidos grasos esenciales.

Por su alta reactividad, los RLO son difíciles de medir directamente. En las últimas décadas se han desarrollado métodos indirectos de medición. Entre ellos medir la cantidad de malonildialdehido, producto de la peroxidación lipídica<sup>144</sup>. Más adelante se han desarrollado la quimioluminiscencia y la resonancia electrón-spin como métodos de medición directa<sup>145</sup>.

En los sistemas biológicos existen muchos mecanismos que implican la formación de radicales libres de oxígeno, como la autooxidación de la hemoglobina, la mioglobina, el citocromo c, las ferredoxinas y catecolaminas. Algunas enzimas como la *aldehido oxidasa* o *flavin deshidrogenasas* también se relacionan con la producción de estos compuestos. La cadena respiratoria mitocondrial no es un mecanismo 100% eficaz y un pequeño porcentaje de electrones se transfieren individualmente generando RLO que no suponen ningún problema para los mecanismos de detoxificación celular (SOD mitocondrial). En determinadas situaciones, como la isquemia-reperfusión, la cadena respiratoria puede verse afectada dando lugar a

una producción más elevada de RLO<sup>146</sup>. Durante la isquemia disminuye el contenido energético celular e incrementa el contenido intracelular de calcio. En la reperfusión, la mitocondria es el único orgánulo capaz de eliminar el exceso de calcio citoplasmático, si bien esta situación parece activar enzimas como la *fosfolipasa A<sub>2</sub>*, que libera ácidos grasos de la membrana mitocondrial. Todo ello altera las interacciones entre los compuestos de la cadena respiratoria y hace que la *NADH deshidrogenasa* transfiera los electrones directamente al oxígeno generando O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

La producción y vertido extracelular de RLO por parte de los macrófagos y de los leucocitos PMN es un mecanismo fisiológico del que disponen los fagocitos para defender al organismo de la agresión bacteriana, pero en determinadas situaciones se ha implicado en la aparición de lesiones tisulares. Este mecanismo se basa en la existencia de una *NADPH oxidasa* asociada a la membrana, que forma una cadena de transporte de electrones que consta de al menos dos componentes: el citocromo b-245 y una flavoproteína. La región de unión al nucleótido está en la cara citoplasmática de la membrana y la región formadora de superóxido en la cara exterior. La figura 13 muestra en esquema la generación de radicales superóxido por los fagocitos. En los macrófagos activados, el consumo de O<sub>2</sub> se ve incrementado. La flavoproteína oxida el NADPH citosólico que viene de la vía de las pentosas fosfato a NADP<sup>+</sup> y los electrones se destinan a reducir el O<sub>2</sub> para la producción de radicales superóxido. Además, el neutrófilo posee *mieloperoxidasa*, enzima intralisosómica que se libera en la vacuola fagocítica y en el

medio extracelular. Esta enzima produce otros metabolitos derivados del oxígeno, los ácidos halógenos, a partir de la utilización del peróxido de hidrógeno generado por la NADPH oxidasa para oxidar el cloro, bromo o el yodo. Estos ácidos halógenos (hipoclorito, hipobromuro e hipoyoduro) y sus aniones son oxidantes muy potentes.

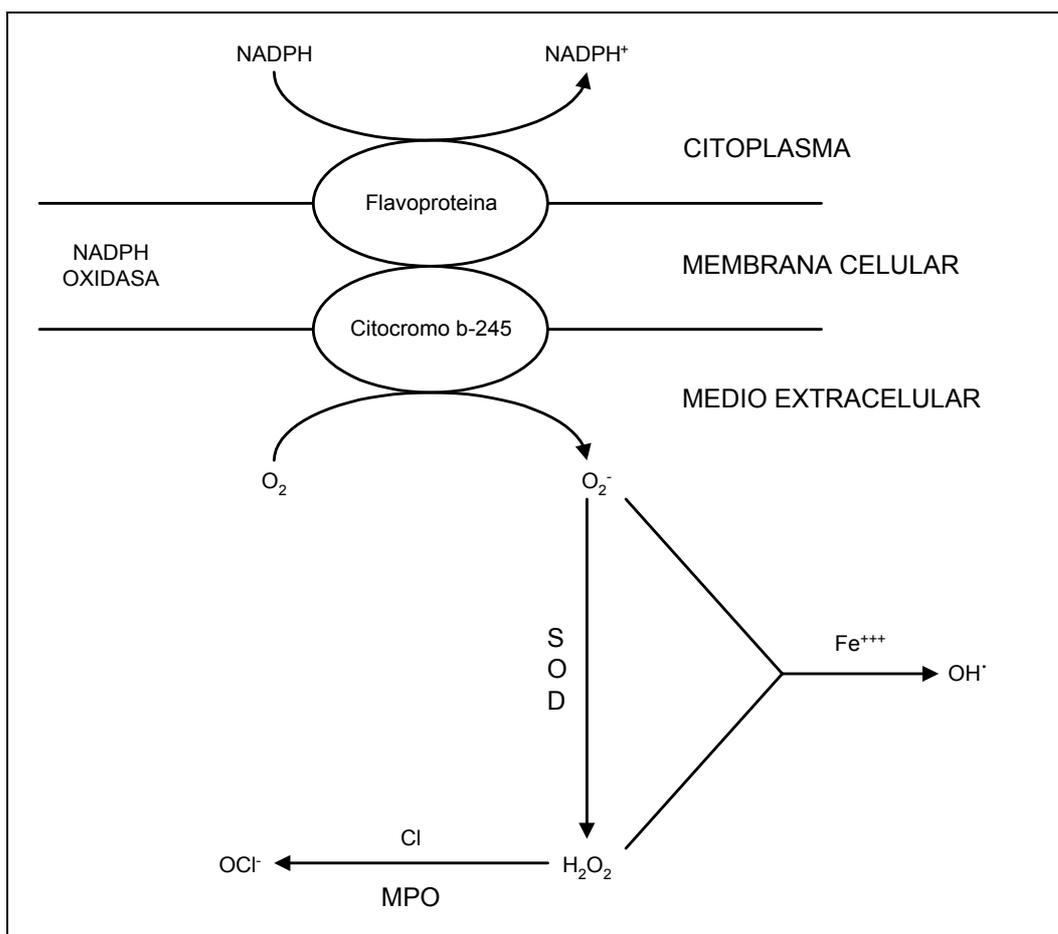


Figura 13. Mecanismos de generación de RLO por parte de los fagocitos.

La implicación del **sistema xantina deshidrogenasa / xantina oxidasa** en la producción de RLO se ha estudiado profundamente, debido a las implicaciones de este sistema en la isquemia-reperfusión de órganos. Este sistema constituye los pasos finales de la vía de degradación de las purinas y la enzima posee dos formas. La más abundante es la NAD dependiente *xantina deshidrogenasa* (XDH), que

cataliza el paso de hipoxantina a xantina cediendo un electrón al  $\text{NAD}^+$  y a continuación el paso de xantina a ácido úrico, cediendo otro electrón a una segunda molécula de  $\text{NAD}^+$ . El mismo enzima puede existir en forma *oxidasa* (XOD), cediendo en este caso los electrones a una molécula de oxígeno a cada paso y dando lugar a dos radicales superóxidos. La conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa puede ser reversible por oxidación de los puentes disulfuro que estabilizan la enzima, o irreversible por proteólisis. La figura 14 muestra la secuencia de eventos en la isquemia-reperfusión.

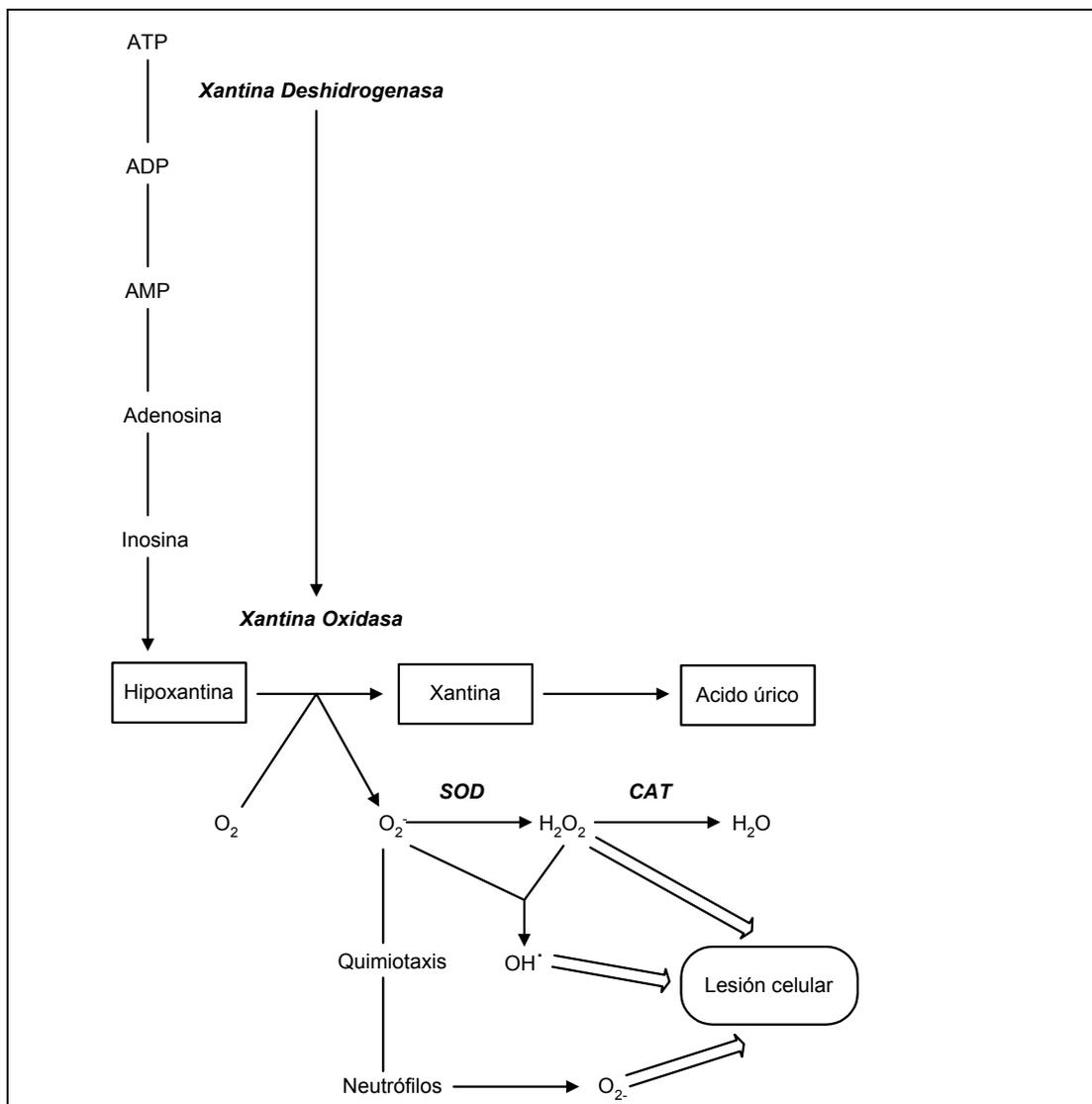


Figura 14. Secuencia de eventos en la isquemia-reperfusión.

Durante la isquemia tisular, la anoxia detiene la cadena de transporte electrónico mitocondrial y se produce una caída en los niveles energéticos celulares. Los compuestos con fosfatos de alta energía se degradan, acumulándose los metabolitos de las purinas, hipoxantinas y xantinas. Al mismo tiempo, la concentración citoplasmática de calcio aumenta, activando las proteasas citoplasmáticas dependientes de calcio y transformando la XDH en XOD. En el momento de la reperfusión tiene lugar un incremento súbito e importante de oxígeno, que conduce a la oxidación de las purinas y a la formación de radicales superóxido. Este radical actúa como quimiotáctico para los neutrófilos, ampliando la lesión<sup>147</sup>. Los RLO generados por la xantina oxidasa pueden favorecer la infiltración por neutrófilos facilitando la adhesión de los mismos al endotelio. Se conoce que el anión superóxido media la expresión de selectinas en la pared endotelial<sup>148</sup>. Durante la pancreatitis, la XOD circulante secretada por el páncreas podría generar radicales superóxido que inducen la síntesis de factor activador plaquetario (PAF) en la célula endotelial pulmonar o serían convertidos a peróxido de hidrógeno por la SOD induciendo la regulación de las P-selectinas. El efecto combinado de PAF y P-selectinas es un requerimiento para el secuestro de neutrófilos<sup>66</sup>, como la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1<sup>149</sup>. La figura 15 ilustra el posible mecanismo de acción de los RLO sobre el endotelio pulmonar mediando el secuestro de neutrófilos. Los mecanismos responsables de la alteración de la membrana endotelial por parte de los RLO incluyen además de la activación de vías que llevan al incremento del calcio intracelular, la activación de señales enzimáticas como la

proteínquinasa C, MAP quinasa, o tirosinquinasa, o la disrupción de la red de filamentos de actina que constituyen el citoesqueleto<sup>150</sup>.

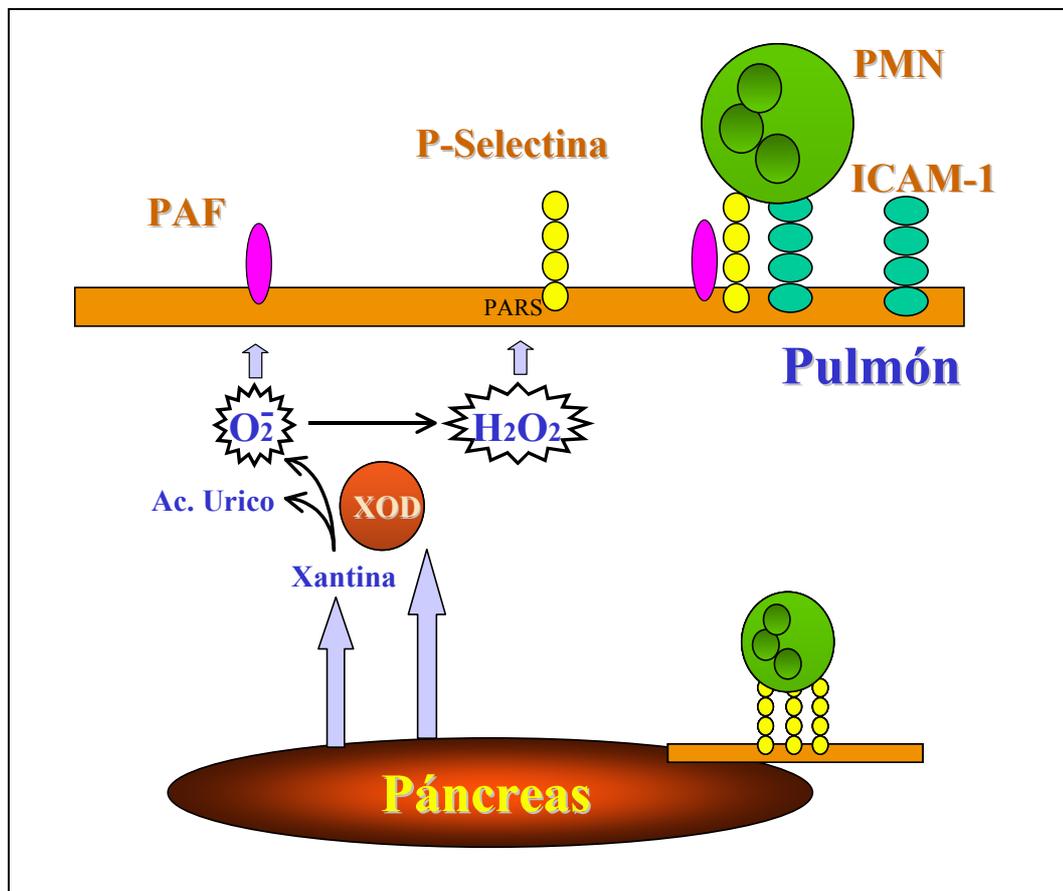


Figura 15. Mecanismo de acción de los RLO sobre el endotelio pulmonar mediando el secuestro de neutrófilos.

Los seres vivos han desarrollado mecanismos de defensa frente a la pequeña cantidad de radicales libres que escapa a la cadena respiratoria mitocondrial. Estos RLO son detoxificados en el interior de la célula por moléculas antioxidantes o “scavengers” de diversos tipos. Entre ellos destacan enzimas como la *SOD*, *catalasas* o *peroxidasas*, o compuestos de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, NADPH, tocoferol, N-metil cisteína y ácido úrico. También los quelantes de iones metálicos protegen de la cadena de reacciones que forman el radical hidroxilo.

Los radicales libres son importantes en multitud de procesos biológicos, como el mecanismo bactericida de los leucocitos. También son importantes mediadores de oncogénesis en enfermedades inflamatorias, participan en la lesión pulmonar en el SDRA, en la lesión renal de la necrosis tubular aguda, en patología relacionada con la hiperoxigenación como la fibroplasia retrolental y en la lesión de reperfusión post-isquemia. En muchos casos aún no se conoce si son la causa o la consecuencia de la enfermedad. De hecho se dan en enfermedades causadas por deficiencias en las defensas anti-radicales como los déficits de selenio y de vitamina E.

Las semejanzas existentes entre las lesiones encontradas en diversos tejidos durante procesos inflamatorios y las lesiones del parénquima pancreático en la pancreatitis aguda, estimularon la investigación sobre la participación de los RLO en la pancreatitis. Se ha demostrado que el tratamiento con agentes anti-radicales disminuye de forma significativa la hiperamilasemia, el edema y el incremento de peso de la glándula tras inducir pancreatitis aguda experimental simulando etiología isquémica o biliar por obstrucción ductal o enólica por hiperestimulación con secretina. La utilización clínica de antioxidantes como el selenio ha mostrado buenos resultados<sup>151</sup>. El pretratamiento con “scavengers” tipo SOD o catalasa es efectivo, así como al añadir alopurinol (inhibidor de la XOD)<sup>152</sup> en esos tres tipos de pancreatitis, si bien su utilidad clínica está en entredicho<sup>153</sup>. Estos experimentos demuestran que los RLO actúan en una etapa precoz y esencial en la patogénesis de la pancreatitis aguda y sugieren que la XOD podría ser el

substrato común. Existe la sospecha de que en el inicio de la cascada inflamatoria se halle la activación de quimiotripsinógeno a *quimiotripsina* en la célula acinar, y este enzima es un activo precursor de la proteólisis de la XDH a XOD<sup>154,155</sup>. La figura 16 muestra un hipotético mecanismo de iniciación de la lesión en la pancreatitis aguda. La fuente de RLO en la pancreatitis aguda experimental ha sido investigada a fondo por nuestro grupo<sup>130</sup>. Comparando dos modelos de pancreatitis aguda experimental (ceruleina y taurocolato) se ha determinado que el aumento de los RLO en el modelo de inducción por taurocolato es debido a la conversión de XDH a XOD tras la muerte celular, mientras que en el modelo con ceruleina son fundamentalmente los neutrófilos la fuente de RLO.

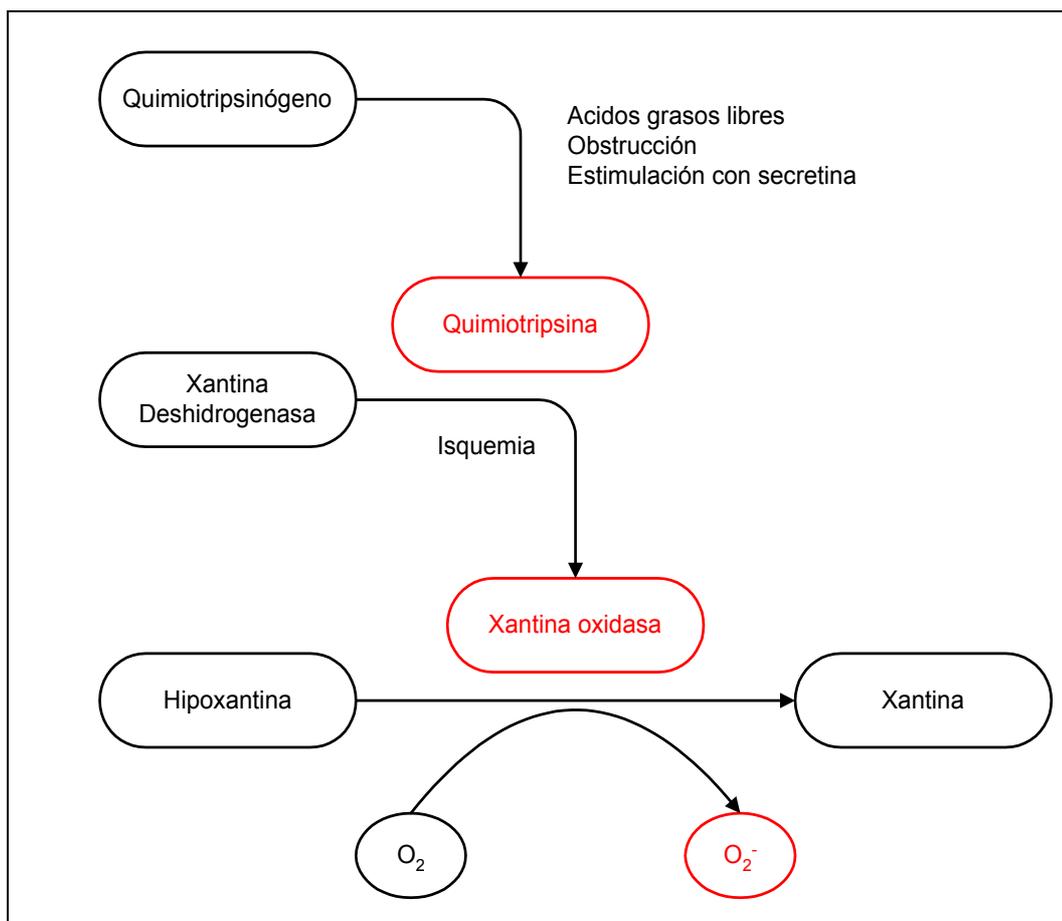


Figura 16. Mecanismo hipotético de iniciación de la lesión en la pancreatitis aguda.

Los RLO están relacionados con el curso evolutivo de la pancreatitis aguda. El desequilibrio entre los sistemas oxidativo y antioxidante es importante en la extensión del daño acinar. Tras el estímulo inicial, la pancreatitis aguda genera un estrés oxidativo que alcanza la circulación portal e induce al hígado a generar mediadores proinflamatorios, que a su vez protagonizarán la respuesta sistémica de la enfermedad<sup>62,156</sup>. En el pulmón, la fuente mayoritaria de RLO son los neutrófilos. De hecho, la depleción de neutrófilos en animales de experimentación mediante anticuerpos específicos previene la lesión pulmonar pero no el desarrollo de la pancreatitis<sup>75</sup>. Así mismo, los aumentos en la actividad XOD en ausencia de otros factores proinflamatorios, no son suficientes para inducir respuesta inflamatoria en el pulmón<sup>157</sup>. Los RLO causan disfunción de la célula epitelial pulmonar mediante el deterioro del transporte vectorial de sodio intracelular e incremento de la permeabilidad. El SDRA puede ser atenuado en modelos experimentales si se produce una intervención farmacológica a tiempo con agentes bloqueadores de los RLO<sup>158</sup>.

#### 1.3.2.2.2 *Eicosanoides*

Los eicosanoides son ácidos grasos de 20 carbonos, metabolizados por los sistemas enzimáticos de la *ciclooxigenasa* (prostanoides: prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos), de las *lipooxigenasas* (leucotrienos, hidroxiácidos y lipoxinas) y de las *epoxigenasas* (epoxiácidos y dihidroxiácidos). Los dos primeros grupos son los más importantes por su implicación en diversos procesos patológicos.

El descubrimiento de estos mediadores lipídicos y su papel en el metabolismo celular tuvo lugar en la década de 1930 al describirse una enfermedad carencial en ratas sometidas a dieta sin grasas<sup>159</sup>. Las consecuencias de esta carencia se revertían suplementando la dieta con ácidos linoleico y araquidónico. Estos dos son ácidos grasos esenciales para el hombre, ya que las células de los mamíferos no poseen la capacidad de introducir dobles enlaces más allá del carbono 9 de la cadena de ácidos grasos. El hombre adquiere los ácidos linoleico y dihomo-gamma-linolénico de fuentes vegetales. Poco más adelante se descubrió que el semen humano, rico en estas sustancias, inducía la contracción de la musculatura uterina<sup>160</sup>, así como extractos de vesícula seminal de otros animales estimulaban musculatura lisa y afectaban a la tensión arterial. De su supuesto origen prostático surge el nombre de prostaglandinas. A mediados de los años 70 se descubren el tromboxano<sup>161</sup> y la prostaciclina<sup>162</sup>. Más adelante aparecen los leucotrienos<sup>163</sup> y otras sustancias derivadas de las lipooxigenasas o del citocromo p450 (epóxidos)<sup>164</sup>.

La síntesis de estas sustancias se realiza en función de los requerimientos momentáneos y no se almacenan. Sus precursores son los ácidos grasos poliinsaturados. El más abundante es el ácido araquidónico (AA), que representa aproximadamente el 2% de los ácidos grasos totales en sangre. El AA se obtiene a través de la ingesta, absorbiéndose en el intestino y circulando en la sangre ligado a la albúmina. Se deposita finalmente en los tejidos, acilando fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. La mayor proporción de AA se

encuentra esterificada en la posición 2' de los fosfolípidos de las membranas celulares. Otra fuente de AA es el ácido linoleico. Este, con una elongación de dos carbonos y una posterior insaturación se transforma en ácido dihomo-gamma-linolénico. Finalmente, si tiene lugar otra insaturación se obtiene el AA. La figura 17 representa el metabolismo del ácido araquidónico.

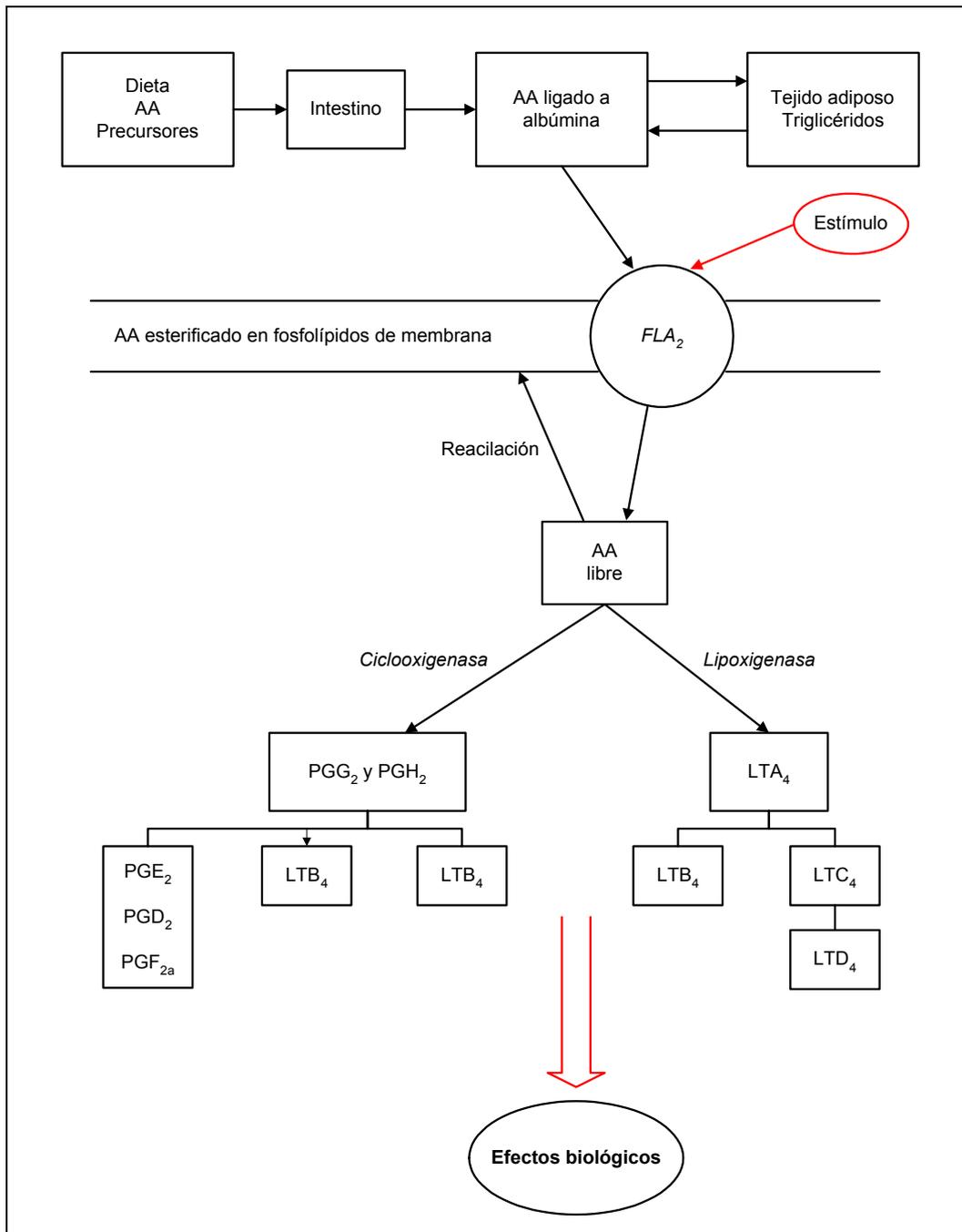


Figura 17. Esquema del metabolismo del ácido araquidónico.

Se considera que el paso limitante en la síntesis de eicosanoides es la disponibilidad del AA libre, aunque también existe una modulación para el control de la expresión genética de los enzimas implicados en la vía de la síntesis. La liberación del AA tiene lugar por la acción de la *fosfolipasa A<sub>2</sub>* (FLA<sub>2</sub>) y la *fosfolipasa C* en respuesta a numerosos estímulos como la trombina, el colágeno, el ADP, la adrenalina, los iones de calcio, la hipoxia, antígenos y otros<sup>165</sup>. La FLA<sub>2</sub> constituye un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del grupo acilo en posición 2 produciendo cantidades equimolares de ácidos grasos libre y lisofosfolípidos. Algunas FLA<sub>2</sub> tienen función digestiva, sin embargo su función más importante la realizan las FLA<sub>2</sub> ligadas a membranas, regulando el recambio de ácidos grasos libres de los fosfolípidos de membrana y manteniendo la estructura de la misma.

Los **prostanoides** son sustancias relativamente inestables, con peso molecular que oscila entre los 300 y 400 D, y solubles tanto en agua como en lípidos. Se clasifican según las letras del alfabeto, en función de la estructura molecular del anillo ciclo-pentano de las prostaglandinas y ciclo-hexano del los tromboxanos (PGA, PGB, PGC...; TXA, TXB...). Existen además tres series de prostanoides, en función del número de insaturaciones presentes en las cadenas laterales de la molécula, que dependerán del ácido graso precursor. La serie 1 se origina a partir del ácido dihomo-gamma-linolénico, la serie 2 a partir del AA y la serie 3 a partir del ácido eicosapentaenoico. En consecuencia tendremos las PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, TXB<sub>1</sub>, TXB<sub>2</sub> etc.

En la vía de la ciclooxigenasa, el AA libre es transformado primero en unos intermediarios lábiles llamados endoperóxidos cíclicos. Este paso es catalizado por la *ciclooxigenasa*, que asociada a la *peroxidasa* constituye el complejo *endoperóxido prostaglandina sintetasa* o PGH sintetasa. Este complejo se halla ampliamente distribuido en las células de los mamíferos, excepto en eritrocitos, y cataliza la formación de PGG<sub>2</sub> a partir de AA mediante la actividad ciclooxigenasa y la reducción de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> mediante la peroxidasa. Los niveles de este complejo enzimático son regulados por diferentes factores como hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y corticoides. Hace menos de una década se describieron 2 formas de la enzima: la *prostaglandin endoperóxido H sintetasa-1* o *ciclooxigenasa 1* (COX-1) y la 2 (COX-2)<sup>166,167</sup>. La COX-1 es una forma constitutiva, presente en la mayoría de células y tejidos, y que regula la secreción fisiológica de prostaglandinas, mientras que la COX-2 es inducible, se expresa en el contexto de procesos inflamatorios por parte de células proinflamatorias, y su síntesis es inducida por citoquinas e inhibida por corticoesteroides. Además, la COX-2 puede tener otros efectos proinflamatorios no relacionados con la síntesis de prostaglandinas, regulando la activación los neutrófilos y su secuestro en lugares de inflamación<sup>168</sup>. Los endoperóxidos se pueden transformar en las diferentes prostaglandinas a través de reacciones enzimáticas catalizadas por isomerasas y reductasas, o bien de manera no enzimática. Así, por la reducción de la PGH<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> se puede obtener PGF<sub>2α</sub>. El estudio del catabolismo de las prostaglandinas ha permitido observar que son rápidamente metabolizadas en circulación y

eliminadas por la orina dentro de las primeras 24 horas tras su administración. Por tanto, las PG son sustancias de actividad muy efímera y su cantidad en un momento dado depende del equilibrio entre síntesis y degradación.

La prostaciclina ( $PGI_2$ ) posee actividad antiagregante plaquetaria y relajante de la musculatura lisa. La enzima responsable de su síntesis, la *prostaciclina sintetasa*, se ha descrito en la íntima de los vasos sanguíneos y parece situarse en las membranas celulares. Tiene una vida media corta pero puede pasar, sin alterarse, por la circulación pulmonar, debido a su dificultad en transportarla. El tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) es un potente agente vasoconstrictor y trombogénico. Inicialmente se describió como metabolito del AA producido por las plaquetas, si bien hoy se conoce que no son su única fuente de producción. Durante la formación de  $TXA_2$  se forman cantidades equimolares de malonildialdehído, marcador de su presencia en tejidos. El  $TXA_2$  tiene una vida media de 30 segundos y se transforma de manera no enzimática en el metabolito estable  $TXB_2$  siendo posteriormente substrato de una deshidrogenasa y delta reductasa.

Los **leucotrienos**, derivados de la vía de las lipooxigenasas, también poseen una nomenclatura alfabética en función de los grupos o sustituyentes que diferencian a cada metabolito. El número del subíndice indica el número de dobles enlaces de la molécula. Como ejemplos tenemos el  $LTA_4$ ,  $LTB_4$ . Los ácidos grasos precursores en el caso de los leucotrienos son el eicosatrienoico para la serie 3, el araquidónico para la serie 4 y el eicosapentaenoico para la serie 5.

El término lipoxigenasa se aplica a una serie de enzimas que catalizan hidroxiperoxidaciones de ácidos grasos. En presencia de O<sub>2</sub> oxigenan el AA y redistribuyen sus dobles enlaces, transformándolo en hidrperóxido (HPETE). A continuación al reducirse de manera enzimática por la *glutathion peroxidasa*, o de manera no enzimática, se generan los hidroxiácidos (HETEs). La 5-lipoxigenasa es la responsable de la síntesis de leucotrienos. Su producto directo es el 5-HPETE, que puede reducirse a 5-HETE, o tomar una molécula de agua y transformarse en un 5,6 epóxido que contiene un grupo trieno conjugado y se denomina LTA<sub>4</sub>. A continuación, este LTA<sub>4</sub> puede seguir dos vías: transformarse en LTB<sub>4</sub> por la *LTA<sub>4</sub> hidrolasa*, o conjugarse mediante la *glutathion S-transferasa* y sintetizar LTC<sub>4</sub>. Este último puede perder residuos aminoacídicos por una *glutamil transpeptidasa* y una *dipeptidasa* que dan lugar a LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, lo que ocurre rápidamente a su paso por el pulmón. Los tres últimos se denominan peptidoleucotrienos y su síntesis se establece principalmente en la línea mieloide. El LTB<sub>4</sub> es relativamente estable, manteniéndose alrededor de 2 horas en circulación para posteriormente degradarse por omega oxidación.

Los eicosanoides actúan como autacoides, es decir, como hormonas “locales”. Este concepto se dedujo al observar que las concentraciones de eicosanoides en plasma eran extremadamente bajas, insuficientes para generar sus efectos. Además, su síntesis no se restringe a un órgano endocrino, sino que ocurre en muchas células de diferentes tejidos. Los efectos de las prostaglandinas afectan a todos los tejidos y a casi todas las funciones del organismo. Diferentes

prostaglandinas pueden tener efectos opuestos sobre el mismo tejido. Así las PGE son broncodilatadoras y causan relajación de la musculatura uterina, y las PGF son broncoconstrictoras y contraen la musculatura uterina. La prostaciclina es vasodilatadora y el tromboxano vasoconstrictor. Los eicosanoides se han implicado en diversos procesos inflamatorios<sup>169</sup>. Los leucotrienos son factores quimiotácticos potentes que promueven la adhesión, diapedesis y agregación de los leucocitos PMN, atrayéndolos a las áreas de inflamación. Las PGs reproducen los síntomas clásicos de la inflamación (vasodilatación, calor, edema y dolor) al ser inyectadas de forma local. Estos síntomas se atenúan si se emplean fármacos que inhiben su síntesis (aspirina, indometacina, corticoides). Otra propiedad importante de las PGs es que confieren citoprotección frente a estímulos agresores como el HCl, alcohol, soluciones hipertónicas de NaCl, calor y otros, como se ha observado en la mucosa gástrica. Las PGE y sus análogos no metabolizables (16,16 dimetil PGE<sub>2</sub>) presentan un marcado efecto citoprotector. El mecanismo de esta citoprotección aun no está claro. Las PGs parecen incrementar la estabilidad de las membranas biológicas<sup>170</sup>. La citoprotección es un fenómeno que se observa tanto tras la administración exógena de PGs, como por las generadas endogenamente.

La participación de los eicosanoides en la pancreatitis aguda experimental se conoce desde hace años y ha sido evidenciada en diferentes modelos<sup>171,172</sup>. El páncreas sintetiza prostanoides y se ve afectado por la liberación de TXA<sub>2</sub> por parte de las plaquetas, de leucotrienos por los neutrófilos circulantes y de prostaciclina por el

endotelio vascular. Los efectos fisiológicos de estos productos afectan al flujo sanguíneo glandular y a la secreción exocrina. En el curso de la pancreatitis aguda se produce una reducción del flujo sanguíneo glandular como consecuencia de la formación de microtrombos tras activación de los mecanismos de la coagulación. Esta isquemia parece ser el mayor contribuyente a la aparición de necrosis<sup>173</sup>. A las PGs se les ha conferido tanto un papel en el desencadenamiento de la pancreatitis aguda, como un efecto protector. En modelos experimentales con ácido taurocólico se ha demostrado la existencia de un desequilibrio en los prostanoideos endógenos en fases iniciales de la enfermedad, mientras que la elevación de los metabolitos de la vía de las lipoxigenasas se produce por infiltración celular, como respuesta más inespecífica, en fases posteriores de la evolución de la pancreatitis<sup>174</sup>. En este modelo se han evidenciado la elevación de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> y TXB<sub>2</sub> a los 5 minutos de la inducción de la pancreatitis, mientras que la elevación de LTB<sub>4</sub> y 15-HETE se produce a los 60 minutos. La excreción urinaria de 2,3-dinor 6-keto-PGF<sub>1α</sub> y de 2,3-dinor TXB<sub>2</sub> aumenta tras la inducción con taurocólico<sup>175</sup>. En modelos de pancreatitis inducida con ceruleína también se han evidenciado niveles altos de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> tisular en páncreas y de 2,3-dinor 6-keto-PGF<sub>1α</sub> en orina, aunque en menor medida que con taurocolato<sup>172</sup>. Estos estudios confirman la alteración en el metabolismo de los prostanoideos y leucotrienos en el curso de la pancreatitis aguda experimental y sugieren un importante papel del endotelio vascular en la respuesta inflamatoria.

Las PGs consideradas citoprotectoras (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>) se han investigado en el tejido pancreático tras pancreatitis

experimental con taurocolato<sup>176</sup>. Poco después de la inducción, los niveles de PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> aumentan mientras que la PGE<sub>1</sub> no varía. Beger demostró un efecto similar en pancreatitis experimental inducida por tripsina, si bien era un efecto más retrasado<sup>177</sup>. La acción más inmediata del ácido taurocólico podría explicarse por un efecto directo sobre la estabilidad de membrana, provocando la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la síntesis de eicosanoides. Otros autores han demostrado variación de la PGE<sub>1</sub> en fases más tardías<sup>178</sup>. El efecto citoprotector se apoya en el hecho de que la inhibición de estas PGs con indometacina, en este modelo experimental, produce un aumento espectacular de la mortalidad y en que la administración de PGE<sub>2</sub> atenúa las lesiones pancreáticas<sup>179</sup>.

La relación entre los RLO, la secreción de prostanoïdes, la actividad fosfolipasa y la peroxidación lipídica fue puesta de manifiesto por nuestro grupo en 1991 en estudios sobre el trasplante pancreático experimental<sup>180</sup>. Los RLO median la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y subsecuente formación de eicosanoides. Por otra parte, existen estudios que investigan de forma conjunta la generación de RLO y la producción de PGs en fases iniciales de la pancreatitis aguda experimental<sup>60</sup>. Se ha demostrado que la administración de dmPGE<sub>2</sub> no solo previene la conversión de xantina oxidasa sino que evita el aumento en los niveles de peroxidación. La estabilización de las membranas celulares evitaría la liberación y activación de enzimas proteolíticos responsables del paso de XDH a XOD y prevendría la formación de RLO. La administración de dmPGE<sub>2</sub> previamente a la inducción de la pancreatitis reduce la producción de prostanoïdes, lo que no se produce cuando el tratamiento

preinducción se realiza con SOD<sup>181</sup>. Estos hallazgos no solo ponen de manifiesto la interrelación entre ambos mediadores sino que también sugieren que antes de la inducción de la síntesis de prostanoïdes por los RLO, en las fases iniciales de la pancreatitis aguda, los prostanoïdes se alteran por un mecanismo independiente de los RLO.

Los productos lipídicos derivados del AA se han implicado también en la patogénesis del SDRA. Las prostaglandinas, en inyección intravenosa pueden reproducir los cambios patológicos a nivel pulmonar y la hipotensión que se aprecian en el shock séptico y el SDRA. Las concentraciones de leucotrienos están aumentadas en el SDRA y sus picos se han relacionado con la evolución del edema pulmonar<sup>182</sup>. El TXA<sub>2</sub> se ha relacionado con la hipertensión pulmonar inducida por la endotoxina<sup>118</sup>. El aumento de la actividad FLA<sub>2</sub> que se observa en la pancreatitis aguda se relaciona con el riesgo de SDRA de estos pacientes, aunque las rutas por las cuales se produce esta lesión no son del todo conocidas. La figura 18 muestra los posibles mecanismos lesivos de la fosfolipasa A<sub>2</sub> a nivel pulmonar.

#### 1.3.2.2.3 Citoquinas

Las citoquinas son una familia de moléculas proteicas de bajo peso molecular (16-25 kDa), liberadas por multitud de células, entre ellas las del sistema inmunológico, y que actúan como mediadores intercelulares<sup>104</sup>. Los fagocitos mononucleares responsables de la inmunidad humoral sintetizan citoquinas efectoras conocidas como *monocinas*. Los linfocitos T activados producen *linfocinas* que sirven para regular la proliferación y diferenciación de varias poblaciones linfocitarias

y otras que actúan en la activación y regulación de células inflamatorias como fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos.

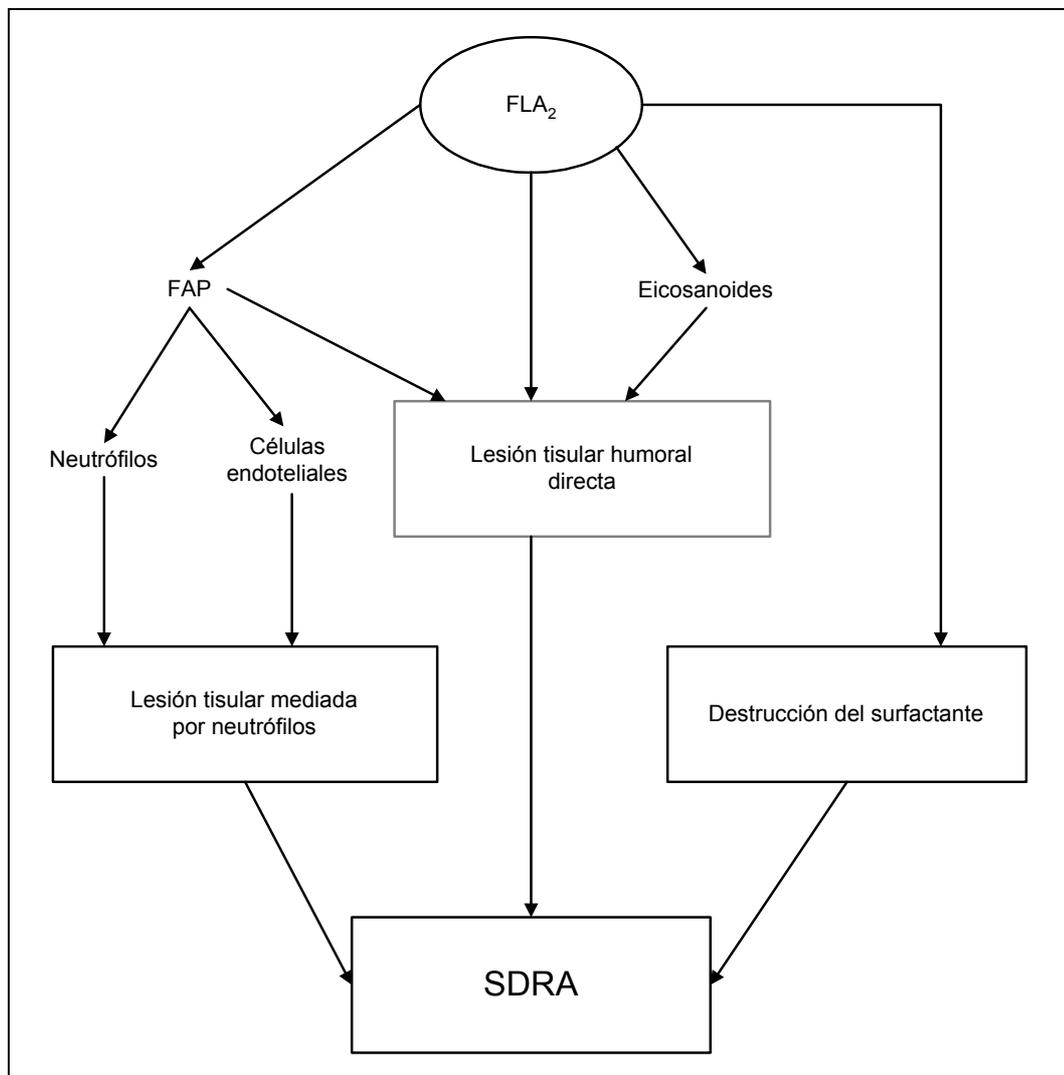


Figura 18. Mecanismos de lesión de la fosfolipasa A<sub>2</sub> a nivel pulmonar.

Estas citoquinas son moléculas efectoras de la inmunidad celular y son responsables de la comunicación entre células del sistema inmunitario e inflamatorio. Las células presentadoras de antígenos elaboran citoquinas que influyen en la diferenciación de linfocitos (figura 19). Por otra parte existen otras citoquinas conocidas como *factores estimuladores de colonias* (CSF), que estimulan la proliferación y diferenciación de leucocitos inmaduros en la médula ósea proporcionando

una fuente de reemplazo para las células que se consumen durante las reacciones inflamatorias.

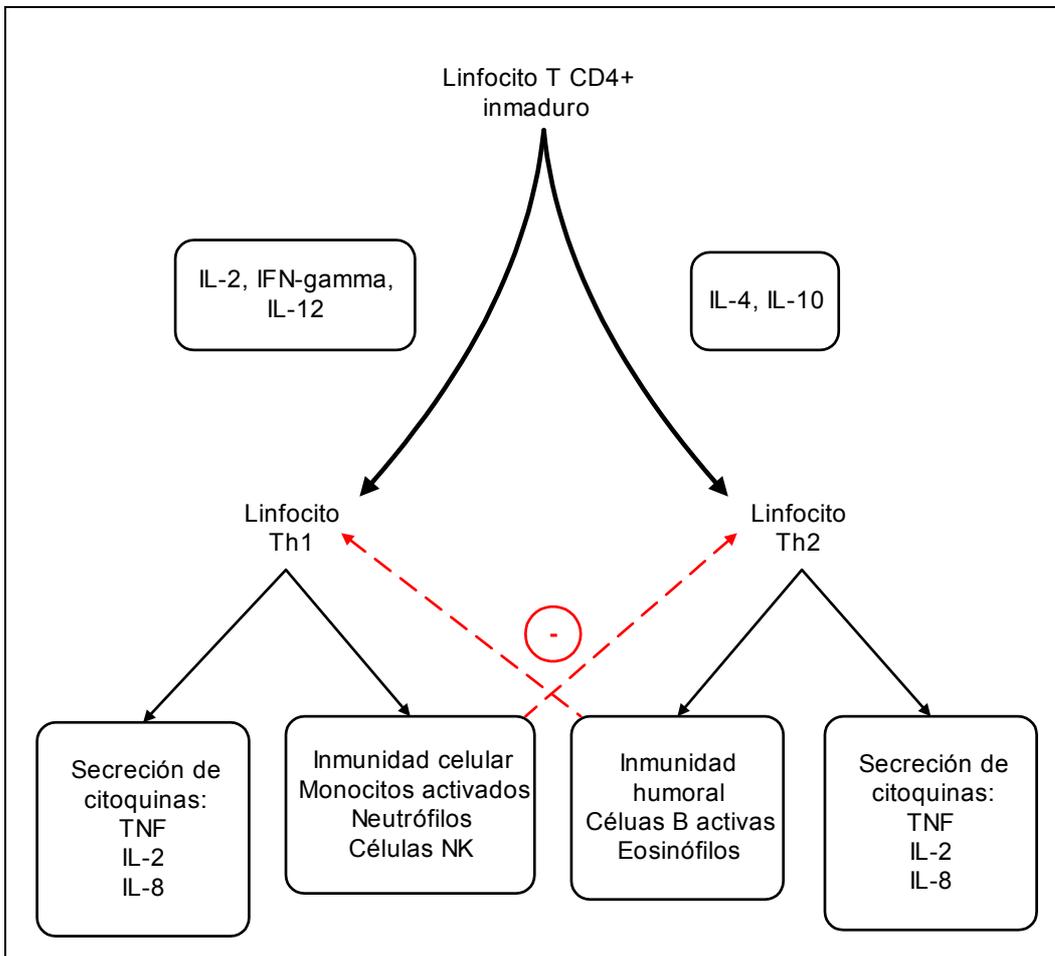


Figura 19. Acción de las citoquinas elaboradas por las células presentadoras de antígeno.

Los primeros estudios sobre citoquinas aparecen entre los años 50 y 70, cuando se descubren los interferones antivirales, los pirógenos y los factores activadores de macrófagos. A partir de estos años los estudios se centran en la purificación y caracterización bioquímica de las citoquinas conocidas, o la producción de antisueros específicos neutralizantes. Se apreció que diferentes propiedades eran mediadas por la misma molécula; así por ejemplo, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es una proteína antiviral derivada de los linfocitos T, y también un activador de las

funciones de los macrófagos. Se creía que las citoquinas eran sintetizadas principalmente por los leucocitos y actuaban sobre otros leucocitos, por ello se las denominó *interleuquinas* (IL). Hasta la fecha se han caracterizado múltiples citoquinas, se han clonado, producido anticuerpos específicos, e incluso se han realizado intentos clínicos de modulación del sistema inmunológico para el tratamiento de enfermedades.

Normalmente, las citoquinas no se hallan en los tejidos y son producidas como respuesta a estímulos por vías inducidas por receptores. Las citoquinas se producen en cantidades pequeñas durante las fases efectoras de la inmunidad. Su secreción es breve, autolimitada, y no se almacenan como moléculas preformadas, iniciándose su síntesis por una nueva transcripción genética transitoria siendo inestables los mRNA que codifican estas proteínas. La expresión de la mayoría de las citoquinas está modulada por factores de transcripción como el Factor nuclear  $\kappa$ B. Solo algunas como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) se expresan de forma constitutiva<sup>104</sup>. Algunas citoquinas pueden controlarse por mecanismos post-translacionales, como la liberación proteolítica de un producto activo. Todas las citoquinas causan su efecto mediante la interacción con receptores altamente específicos de la superficie celular. La mayoría de ellas tienen actividad pleiotrópica y presentan múltiples efectos según las células diana. Estas células diana pueden ser la propia célula secretora (acción autocrina), una célula cercana (acción paracrina) o una célula distante a la que se llega por la circulación (acción endocrina). Muchas citoquinas tienen efectos similares

y presentan una gran redundancia, de modo que en ausencia de una citoquina concreta, otras pueden ejercer su función. Este hecho es de gran importancia en la potencial terapia antagónica, puesto que inhibir una sola citoquina no se ha mostrado tratamiento eficaz en diversos ensayos sobre pancreatitis<sup>183</sup>. Para muchas células diana, las citoquinas actúan como reguladores de la división celular, es decir como factores de proliferación.

El descubrimiento y caracterización de nuevas citoquinas es un campo en constante expansión. En la actualidad existen numerosas citoquinas relacionadas con la inflamación, el crecimiento y diferenciación celular o la inmunidad. Entre ellas destacan interleuquinas (1, 6, 8, 10), interferón ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ), TNF ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), factores de crecimiento, diferenciación y migración celular (factor transformador del crecimiento- $\beta$  o TGF- $\beta$ , factor inhibidor de la migración o MIF, factores estimuladores de colonias de granulocitos-macrófagos o GM-CSF, de monocitos-macrófagos o M-CSF, y de granulocitos o G-CSF), quemoquinas o citoquinas quimiotácticas como la MIP-1 o MIP-2. Originalmente, la medición de citoquinas se realizaba en base a ensayos sobre sus efectos funcionales como la quimiotaxis de leucocitos, liberación intracelular de enzimas y producción de radicales libres de oxígeno. Posteriormente se han desarrollado técnicas de inmunoensayo, radioinmunoensayo y técnicas de tinción inmunohistoquímica<sup>123</sup>.

La **interleuquina 1** es una citoquina proinflamatoria cuya fuente principal es el fagocito mononuclear activado, aunque también se produce en células endoteliales y epiteliales. La actividad biológica de esta

citoquina reside en dos cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , productos de genes diferentes y con pesos de 17 kDa. Ambas cadenas tienen una homología estructural inferior al 30% pero se unen a los mismos receptores de superficie celular y sus actividades biológicas son similares. Los dos polipéptidos se sintetizan en forma de precursores, el de la IL-1 $\alpha$  es biológicamente activo mientras que el de la IL-1 $\beta$  debe procesarse antes de ejercer sus funciones. En los fagocitos mononucleares se ha identificado una proteasa responsable de la activación de la IL-1 $\beta$ . La mayor parte de la actividad de la IL-1 en la circulación corresponde a la cadena IL-1 $\beta$ .

Los efectos biológicos de la IL-1 dependen de la cantidad de citoquina liberada. A concentraciones bajas, los principales efectos derivan de su acción como mediador local de la inflamación. Actúa sobre fagocitos mononucleares y endotelio vascular induciendo su propia síntesis y la de otras citoquinas como IL-2, IL-6 e IL-8. Actuando sobre el endotelio promueve la coagulación y la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión de los leucocitos. A concentraciones altas la IL-1 entra en el torrente circulatorio y actúa como pirógeno, induce la síntesis hepática de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, estimula la proteólisis muscular, la reabsorción ósea y aumenta la formación de neutrófilos en la médula ósea. La IL-1, al unirse a su receptor, inicia diversos cambios bioquímicos como la fosforilización de la proteinquinasa asociada a mitógenos (MAPK), activación de fosfatasa y fosfolipasas, aumenta la transcripción de la ciclooxigenasa-2 o del NF $\kappa$ B.

Existe amplia evidencia de la participación de la IL-1 en la patogénesis de las secuelas sistémicas del shock causado por endotoxinas o politraumatismos, y en las cascadas inflamatorias de la pancreatitis, sobre todo en fases iniciales. La administración intraperitoneal del antagonista del receptor de la IL-1 disminuye la mortalidad y destrucción hística en modelos experimentales<sup>184</sup>.

La **interleuquina 2** es un producto de los linfocitos T<sub>H</sub> y un componente esencial de la respuesta inmune. Es responsable del crecimiento de las células T. En modelos murinos de pancreatitis, sepsis o quemaduras la producción de IL-2 disminuye, los niveles de receptor soluble de la IL-2 aumentan y son predictivos de mala evolución. En pacientes con pancreatitis post-CPRE los niveles de este receptor alcanzan un pico a los 6 días de evolución. Todo ello apoya un papel de esta citoquina en la pancreatitis aguda<sup>185,186</sup>.

La **interleuquina 4** es una citoquina antiinflamatoria que modula la producción de citoquinas por las células T, B, NK, monocito-macrófagos y fibroblastos. Su papel en la pancreatitis aguda aún no está dilucidado.

La **interleuquina 6** es la principal citoquina mediadora de la síntesis de proteínas de fase aguda como el fibrinógeno, haptoglobina y proteína C reactiva. Es producida por los fagocitos mononucleares y células endoteliales en respuesta a estimulación por IL-1 y TNF. Una característica peculiar de esta citoquina es su detección principalmente en la circulación sistémica, lo que denota su función endocrina. Niveles elevados de esta IL-6 se han encontrado en pacientes con cirugía mayor,

quemaduras graves, infecciones bacterianas y rechazo de injertos renales<sup>63</sup>.

La **interleuquina 8** es una potente citoquina selectiva para la quimiotaxis de las células T y neutrófilos, secretada por muchas células, principalmente fagocitos mononucleares tras el estímulo de otras citoquinas como el TNF. La IL-8 induce todas las respuestas relacionadas con la quimiotaxis, es decir, activación del aparato motor de los neutrófilos y de su migración direccional, expresión de moléculas de superficie, liberación de enzimas en forma dosis dependiente y producción de metabolitos reactivos del oxígeno. La IL-8 es la primera citoquina en aparecer en el suero de pacientes con pancreatitis<sup>187</sup>, es el mayor factor quimiotáctico de neutrófilos en el pulmón, y su producción está aumentada tras episodios de hipoxia-hiperoxia o en la alveolitis<sup>188</sup>.

La **interleuquina 10** es una citoquina natural con propiedades antiinflamatorias por sus efectos en la inhibición de funciones de los macrófagos, como la producción de TNF, IL-6 o IL-1 y liberación de RLO. Modula la diferenciación de las células T<sub>H</sub> en T<sub>H2</sub> y es secretada principalmente por éstas últimas, los monocitos y las células B. Representa por todo ello un factor de feed-back endógeno que controla la respuesta inmune y la inflamación. Tanto en la pancreatitis aguda experimental como en la clínica, los niveles de IL-10 se correlacionan inversamente con la severidad de la pancreatitis<sup>189-191</sup>. La supervivencia de pacientes con SDRA se correlaciona también con los niveles elevados de IL-10 en el lavado broncoalveolar. Ello sugiere posibles aplicaciones terapéuticas utilizándolo como factor supresor no antígeno específico en

ciertas enfermedades autoinmunes o como agente antiinflamatorio en la pancreatitis aguda<sup>123</sup>. En un estudio experimental, Zou emplea terapia génica con IL-10 humana y consigue disminuir la severidad de la pancreatitis aguda<sup>192</sup>.

El **factor de necrosis tumoral** o **TNF** es una citoquina pleiotrópica, predominantemente derivada de los fagocitos mononucleares y otras células. Su primera descripción en la literatura data de 1975, pero la historia de su descubrimiento comienza con las observaciones de W.B. Coley, cirujano que comprobó que algunos tumores remitían o desaparecían en algunos pacientes tratados con vacunas derivadas de bacterias muertas<sup>193</sup>. En el macrófago, el TNF se sintetiza como una proteína transmembranosa no glucosilada de aproximadamente 25 kDa. Un segmento de 17 kDa, incluido en el segmento carboxi-terminal, es separado por proteólisis de la membrana plasmática del fagocito mononuclear para producir un homotrímero estable, la forma secretada que constituye el TNF- $\alpha$ , de vida media corta. Esta molécula es producida, además de por macrófagos, por linfocitos T y B, las células NK, los astrocitos y células de Kupffer, en respuesta a bacterias, virus, otras citoquinas (GM-CSF, IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ ), complejos inmunológicos, al factor C5a del complemento y a RLO. Las acciones del TNF $\alpha$  se inician por la unión del trímero a receptores de la superficie celular. Se han descrito dos receptores del TNF $\alpha$ , con pesos moleculares de 55 y 75 kDa. Ambos actúan aumentando la transcripción nuclear de NF $\kappa$ B, que se une a su vez a las zonas promotoras de varios genes. Los niveles de estos receptores se han empleado como marcadores de actividad del TNF $\alpha$ . El

receptor  $R_1TNF\alpha$  (p55) puede estar involucrado en los mecanismos de apoptosis<sup>104</sup>. La afinidad del  $TNF\alpha$  por sus receptores es sorprendentemente baja para una citoquina, pero se sintetiza en grandes cantidades y los satura con facilidad. Los receptores  $R_1TNF\alpha$  se encuentran en casi todos los tipos celulares y los  $R_2TNF\alpha$  son más característicos de leucocitos y células endoteliales. La unión del  $TNF\alpha$  a su receptor de membrana provoca la hidrólisis de una parte de la molécula que conserva la capacidad de unirse al  $TNF\alpha$ , y así las células activadas se desprenden de los conocidos como receptores solubles, pudiendo actuar como inhibidores competitivos del receptor de superficie celular o unirse al  $TNF\alpha$  circulante disminuyendo su biodisponibilidad<sup>194</sup>. Los receptores libres del  $TNF\alpha$  podrían actuar uniéndose e inactivando el  $TNF\alpha$  circulante, o bien estabilizando la molécula y aumentando su vida media. El tratamiento con receptores solubles de  $TNF\alpha$  humano resultó en la atenuación de la síntesis de citoquinas inducida por  $TNF\alpha$  y de la inestabilidad hemodinámica en animales con sepsis por gérmenes gram negativos<sup>195</sup>. Por contra, el hecho de que los pacientes con altas concentraciones de receptor soluble y  $TNF\alpha$  libre indetectable desarrollen complicaciones sistémicas de la pancreatitis va a favor de un papel proinflamatorio más que de tampón<sup>196</sup>.

Las acciones biológicas del  $TNF\alpha$  varían en función de su cantidad. A concentraciones bajas ( $10^{-9}M$ ) actúa localmente como un regulador paracrino y autocrino de leucocitos y células endoteliales. Produce la expresión en éstas últimas de receptores de superficie o moléculas de adhesión que permiten la adherencia a la superficie endotelial de

leucocitos neutrófilos, monocitos y linfocitos. Así aumenta la acumulación de estas células en los focos inflamatorios. Por otra parte activa leucocitos eosinófilos y fagocitos mononucleares y sobre ellos induce la producción de otras citoquinas, IL-1, IL-6, el propio  $\text{TNF}\alpha$  y quimiocinas. Cuando la producción es mayor, el  $\text{TNF}\alpha$  se libera al torrente circulatorio, actúa como hormona endocrina y desarrolla efectos sistémicos. El  $\text{TNF}\alpha$  posee efectos sinérgicos con la IL-1, pero además causa apoptosis de forma directa. Induce la síntesis de prostaglandinas al interactuar con las células reguladoras del hipotálamo. Actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas como la proteína C reactiva, la macroglobulina  $\alpha_2$ , el fibrinógeno y la proteína A del amiloide dando lugar a la conocida como “respuesta de fase aguda”. Tiene actividad sobre el sistema de la coagulación y es capaz de producir linfopenia e inmunodeficiencia al actuar sobre la célula madre de la médula ósea. Producido de forma crónica da lugar a un estado de caquexia, al crear una disfunción metabólica caracterizada por el desgaste de células musculares y grasas, lo que le valió el nombre de “caquectina”. Cuando las concentraciones de  $\text{TNF}\alpha$  son masivas ( $>10^{-7}$ ), como en el contexto de sepsis por bacterias gram negativas, se produce una situación similar al shock, con muerte de los animales de experimentación por colapso circulatorio y CID. El  $\text{TNF}\alpha$  deprime la contractilidad miocárdica, mediante la inducción de la *óxido nítrico sintetasa*, que convierte la arginina en citrulina y óxido nítrico (éste último responsable de la acción final). Además, el  $\text{TNF}\alpha$  disminuye la tensión arterial actuando directamente sobre las células musculares lisas e indirectamente

estimulando la producción de vasodilatadores como la prostaciclina y el NO por las células endoteliales vasculares. Finalmente, a altas concentraciones, el TNF  $\alpha$  da lugar a hipoglicemia, debido a la utilización excesiva de glucosa por el músculo y a la incapacidad del hígado para reemplazarla<sup>123</sup>.

El **factor activador plaquetario** (PAF) es una citoquina proinflamatoria de estructura fosfolipídica, secretada por las células endoteliales, plaquetas, macrófagos y neutrófilos. Es un componente estructural de las membranas celulares y se libera bajo la acción de la fosfolipasa A2. Se le ha reconocido un papel en diferentes entidades patológicas como el asma, la isquemia, la úlcera gastroduodenal y el fallo multiorgánico. Participa activamente en la agregación plaquetaria, en la activación de las células polimorfonucleares, causando la quimiotaxis, agregación, secreción de superóxidos y degranulación de estas células. Induce la expresión de moléculas de adhesión y tiene potentes efectos endocrinos, similares a los de la endotoxina, como cambios sistémicos en las células endoteliales y redes capilares que aumentan la permeabilidad vascular en pulmones, riñones, sistema gastrointestinal y corazón, llevando al SIRS<sup>197</sup>. Su administración en animales de experimentación induce una pancreatitis aguda y liberación de amilasas de acinos pancreáticos aislados<sup>198</sup>. En la pancreatitis aguda inducida por taurocólico el PAF se libera en páncreas, ascitis, sangre y pulmón. El lexipafant es un potente inhibidor del PAF por antagonismo con sus receptores, que se emplea con relativo éxito clínico en la pancreatitis, mostrando una disminución en la incidencia de fallo orgánico y reducción de marcadores

de la inflamación<sup>187</sup>, sin embargo, en estudios de fase III no ha demostrado diferencias significativas en mortalidad<sup>183</sup>.

Existen otras citoquinas, cuyo análisis excede los límites de esta tesis, si bien cabe citar la familia de las **quemoquinas**, pequeñas moléculas involucradas en la activación y tráfico de leucocitos a los lugares de inflamación e infección. Actualmente se considera que la IL-8 forma parte de esta familia de moléculas. La proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP), secretada no solo por estas células sino también por fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, se libera por acción del TNF y la IL-1. Esta molécula tiene un efecto puramente quimiotáctico sobre las células, sin participar en la liberación de RLO o enzimas lisosomales. El papel de la MIP-2 en la lesión pulmonar se ha estudiado en modelos de sepsis inducida por endotoxinas y neumonía por gram negativos, provocando, en ambos casos la activación de los macrófagos alveolares e infiltración por neutrófilos desembocando en el distrés respiratorio. Otro exponente de las mismas es la proteína quimiotáctica de los monocitos (MCP-1). Se ha observado, tras la estimulación con etanol, un aumento de la producción de MCP-1 por los acinos pancreáticos. Otro papel de las quemoquinas es la modulación de la respuesta inmune por el reclutamiento selectivo de células Th1 y Th2<sup>104</sup>.

Aunque muchas de las acciones de las citoquinas son beneficiosas, también producen efectos dañinos para el huésped. Su capacidad de inducir actividades en la célula a concentraciones pico o femtomolares hace que tengan un papel crítico en la propagación local y sistémica de la inflamación. En la pancreatitis aguda, tras la lesión celular,

los leucocitos presentes en la reacción inflamatoria local inician la producción de citoquinas. De hecho, se han detectado tanto en humanos como en animales de experimentación, niveles elevados de IL-6 e IL-8 en la circulación, llegando a utilizarse como marcadores específicos de severidad<sup>199</sup> con sensibilidad y especificidad superior al 87%. Las citoquinas pueden inducir la apoptosis de la célula acinar y exacerbar la necrosis pancreática. Otras citoquinas, como la IL-1 o el TNF, solo son detectables en una parte de los pacientes, en relación con las lesiones hepática y pulmonar, y el bloqueo de ambas citoquinas puede disminuir experimentalmente la severidad de la pancreatitis. Estas moléculas pueden actuar como reguladoras de la expresión de otras citoquinas y tienen un papel clave en la propagación de la respuesta inflamatoria, si bien son incapaces de iniciar una pancreatitis<sup>52</sup>. La observación de un decalaje temporal entre la producción de citoquinas localmente en el páncreas y su aparición posterior, en casos graves, en órganos como hígado, bazo o pulmón, así como la ausencia de las mismas en otros como riñón y músculo esquelético, lleva a la conclusión de que su producción es organo-específica, se correlaciona con la severidad y que son los leucocitos residentes más que los circulantes los responsables de su aparición. Ello viene refrendado también por la ausencia de citoquinas en sangre periférica durante la pancreatitis<sup>108</sup>. De hecho, los niveles de TNF $\alpha$  tras la inducción de pancreatitis aguda experimental han sido variables y de difícil interpretación. Lo que sí está demostrado, y que implica al TNF en el desarrollo de la pancreatitis, es la elevación sérica de sus receptores solubles (RsTNF<sub>55</sub> y RsTNF<sub>75</sub>)<sup>194</sup>, que refleja el grado de

liberación de TNF en el proceso, y la producción de TNF a nivel pancreático, objetivada por la inducción de la transcripción de mRNA TNF $\alpha$  por los macrófagos que infiltran la glándula.

El antagonismo frente a las citoquinas fue una vía de investigación terapéutica, iniciada por los contradictorios estudios de Guice<sup>200</sup> en un modelo de pancreatitis inducida por ceruleína, que demostraban un aumento del edema pancreático en los animales tratados. Estudios posteriores, con antagonistas más específicos en un modelo de infusión retrógrada de taurocolato, observaron mejoría en los parámetros bioquímicos que miden la evolución de la pancreatitis<sup>201</sup>, y la utilización de anticuerpos anti-TNF específicos de especie disminuía el edema, la necrosis y la inflamación. Norman, mediante la inhibición del TNF circulante con la forma dimérica recombinante del receptor del TNF, halló mejoría en la severidad y mortalidad de la pancreatitis. Además mostró un efecto más eficaz al emplear este antagonista de forma retrasada, es decir terapéutica, comparado con la administración profiláctica<sup>202</sup>. Por otro lado la inhibición de la actividad de la IL-1 también se ha demostrado beneficiosa en el tratamiento de la pancreatitis aguda experimental. Más adelante los estudios que se han desarrollado han ido dirigidos al bloqueo de la síntesis de estos mediadores, más que a su antagonismo. Ello se ha conseguido mediante la pacificación de macrófagos, inhibiendo la modificación posttranscripcional de la pro-IL-1, o explotando las características de la IL-10 como citoquina inhibitoria<sup>203</sup>.

El papel de las citoquinas como efectoras y potenciadoras de la lesión pulmonar asociada a la pancreatitis es conocido, así como su

participación en la patogénesis del SDRA<sup>117</sup>. La infiltración por leucocitos activados es una característica de la lesión. Los macrófagos alveolares activados producen grandes cantidades de TNF, proteína inhibidora de los macrófagos (MIP-2) y proteína quimiotáctica de monolitos (MCP-1). Esta última atrae a los leucocitos que expresan el receptor de quimiocinas CCR-2 desarrollando el infiltrado inflamatorio pulmonar<sup>204</sup>. El bloqueo del TNF reduce la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio pulmonar.

#### *1.3.2.2.4 Moléculas de adhesión*

Las moléculas de adhesión son un grupo heterogéneo de proteínas de membrana celular. Su función más importante es la adherencia y migración del leucocito activado a través del endotelio, pero también participan en la hematopoyesis y maduración de los leucocitos en órganos como el timo<sup>205</sup>. Entre ellas destacan las moléculas de adhesión de la célula vascular o VCAM, las integrinas ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), las moléculas de adhesión intercelular o ICAM, la molécula de adhesión entre plaqueta y endotelio o PECAM y las selectinas.

Estudios recientes han demostrado un papel de la **ICAM-1** en la respuesta sistémica a la pancreatitis. Esta molécula se expresa de forma constitutiva en órganos como el pulmón, hígado, bazo o riñón, y sus niveles no se ven afectados durante la inducción de la pancreatitis, mientras que en otros órganos como el páncreas, sus niveles son incluso escasos según el modelo de pancreatitis realizado<sup>66</sup>. La utilización de anticuerpos anti-ICAM-1 ha demostrado tanto una mejoría en la lesión pulmonar en animales sometidos a pancreatitis inducida por dieta<sup>206</sup>,

como un menor grado de lesión necrótica de la célula acinar y apoptosis en la pancreatitis inducida por taurocolato al 3%<sup>207</sup>.

La familia de las **selectinas** está compuesta por tres receptores con estructura glicoproteica, expresados por las células endoteliales (E-selectina), leucocitos (L-selectina), o plaquetas y endotelio (P-selectina), susceptibles de división proteolítica y por ello de existir en forma soluble en la circulación. La *E-selectina* o ELAM-1 está involucrada en la adherencia de los linfocitos al endotelio vascular en lugares de rechazo y no se expresa de forma constitutiva en el endotelio sino que se sintetiza tras el estímulo inflamatorio. Es un marcador de activación endotelial. La *L-selectina* o LECAM-1 se expresa constitutivamente en los neutrófilos y se desprende de ellos cuando están activados. También se expresa en células progenitoras, participando en la hematopoyesis. La *P-selectina* se almacena preformada como un componente de la membrana de la célula endotelial y se expresa rápidamente tras la estimulación celular por diversos agonistas como la trombina, histamina o factores del complemento. Así mismo también se estimula su síntesis de forma dosis-dependiente por mediadores proinflamatorios como el TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o el lipopolisacárido<sup>134</sup>. La inducción de la P-selectina es un evento importante que desencadena la infiltración pulmonar por neutrófilos en la pancreatitis aguda, participando en la fase de rodamiento de los leucocitos en su interacción con el endotelio. Los pacientes con inflamación sistémica y sepsis tienen elevados niveles de E y P-selectinas y estas son las moléculas de adhesión que más rápidamente se expresan en respuesta a citoquinas. En pacientes con pancreatitis aguda, los niveles de E-selectina

plasmática se correlacionan con la severidad, mientras que los de P-selectina se mantienen constantes, si bien son más altos en pacientes que no sobreviven<sup>134</sup>. En un modelo de shock con oclusión de la arteria esplácnica en ratas, se correlacionaron niveles altos de TNF $\alpha$  y E-selectina con un menor tiempo de supervivencia<sup>208</sup>. Sin embargo, parece ser que la acumulación de neutrófilos en tejidos lesionados depende de la interacción de múltiples factores más que de la interacción de éste único receptor, como demuestran estudios realizados en ratas con deficiencia de E-selectina<sup>209</sup>. La forma soluble de la L-selectina (sL-selectina) es funcionalmente activa y juega un importante papel en la regulación de la adhesión leucocitaria al endotelio. Donnelly demostró una relación inversa entre los niveles de sL-selectina y la progresión de la lesión pulmonar en el SDRA, considerando esta molécula como un marcador de activación pan-endotelial<sup>210</sup>.

En la pancreatitis aguda experimental, los niveles de expresión de P-selectina en páncreas y pulmón aumentan tras la inducción, si bien en otros órganos permanecen en niveles basales, expresándose de forma constitutiva. En el páncreas existe infiltración leucocitaria antes de que se demuestre expresión de P y E-selectinas, lo que sugiere la participación de otros mecanismos en la aparición local de estas células<sup>64</sup>. Los radicales libres de oxígeno generados por la XOD en esta enfermedad pueden actuar como inductores de la expresión de P-selectina a nivel sistémico, como demuestra el hecho de que en animales tratados previamente con el inhibidor de la XOD oxipurinol, los niveles de P-selectina en pulmón fueran bajos tras inducir la pancreatitis<sup>66</sup>.

#### 1.3.2.2.5 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), inicialmente denominado factor relajante dependiente del endotelio, es un mediador biológico muy primitivo en la evolución animal y un sistema ampliamente distribuido de regulación de la función celular y la comunicación intercelular. Fue descubierto en 1987 y su presencia se ha demostrado en procesos como la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la erección peneana<sup>211,212</sup>. Las investigaciones sobre nitrosaminas y carcinogénesis permitieron observar que las células de los mamíferos metabolizaban L-arginina produciendo un compuesto de óxido nítrico de gran reactividad. Las acciones citotóxica y citostática de los macrófagos requerían como sustrato la L-arginina. También se descubrió que la acción del factor relajante derivado de las células endoteliales era debida a la liberación de NO por estas células<sup>213</sup>.

El NO se sintetiza a partir del nitrógeno de la guanidina terminal de la molécula de L-arginina en presencia de oxígeno molecular, por acción de una *NO sintetasa* (NOS), dando lugar a NO y L-citrulina. El NO así formado reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub> para formar NO<sub>2</sub>, que en solución se degrada a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a su vez reacciona con la oxihemoglobina para producir NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y metahemoglobina. Se ha estimado que la vida media del NO en solución es de menos de 4 minutos, mientras que en los sistemas biológicos es de 3 a 30 segundos, debido a su rápida inactivación por el anión superóxido y la unión a proteínas con el grupo hemo. La síntesis del NO se realiza de forma fisiológica en el endotelio, en el sistema nervioso y en las plaquetas,

dependiendo en su formación de una *NOS constitutiva* (cNOS), calcio-calmodulina dependiente, que está siempre presente en los tejidos y que libera pequeñas cantidades de NO durante periodos cortos tras su activación. La cNOS en el endotelio vascular es activada por la acción de la acetilcolina o la bradicinina en receptores específicos, o por el efecto del flujo sanguíneo sobre las células endoteliales. El NO producido difunde hacia el músculo liso, induciendo su relajación por la acción de la guanilatociclasa y generación de GMPc. Este sistema nitrovasodilatador endógeno es el responsable del tono vasodilatador en que se encuentra el sistema cardiovascular en condiciones fisiológicas.

A diferencia de otros mediadores, el NO tras su formación no se almacena en gránulos y se libera ante determinados estímulos, sino que difunde libremente desde el lugar de formación<sup>214</sup>. La disfunción de la producción de NO por el endotelio se ha demostrado en la arteriosclerosis, en la hipertensión esencial y en la asociada a la insuficiencia renal crónica. Por su efecto vasodilatador arteriolar y broncodilatador, el NO se ha utilizado por vía inhalatoria en el SDRA. Este síndrome presenta un cortocircuito intrapulmonar con hipoxemia arterial, hipertensión pulmonar aguda por vasoconstricción y obstrucción vascular con edema pulmonar secundario. El NO disminuye la hipertensión pulmonar, mejora la oxigenación y disminuye el cortocircuito arteriovenoso, sin provocar hipotensión sistémica debido a su rápida inactivación por la hemoglobina.

Por otra parte, las células del sistema retículoendotelial en presencia de endotoxinas y determinadas citoquinas, como el TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$

o IFN- $\gamma$ , son capaces de sintetizar de novo una enzima productora de NO calcio-calmodulina independiente, denominada *NOS inducible* (iNOS), e iniciar la producción de grandes cantidades de NO durante periodos de tiempo prolongados. Este NO es utilizado entonces como un sistema citotóxico contra diferentes microorganismos y células tumorales. La liberación de NO por la iNOS de los macrófagos es unas 1000 veces superior a la cantidad liberada por las células endoteliales. Esta síntesis masiva de NO por la iNOS es la que parece responsable de los efectos perjudiciales del NO, mediados en parte por la acción del ion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que se forma por la reacción del NO con el ion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). El  $\text{ONOO}^-$  es un poderoso oxidante que induce lipoperoxidación y se monitoriza por la determinación de los niveles de malonildialdehído. La liberación masiva de NO por el sistema iNOS se ha implicado en la fisiopatología del shock endotóxico y en los procesos de alteración de la coagulación que se producen tras la lesión endotelial masiva<sup>213</sup>. En el shock endotóxico, la liberación de NO en la pared vascular explicaría la hipotensión e hiporreactividad a los vasoconstrictores en el curso del shock séptico. Esta vasodilatación se puede revertir por análogos de la L-arginina que inhiben la síntesis de NO como  $\text{N}^G$  monometil-L-arginina. También durante el shock endotóxico se ha observado un aumento de la síntesis de NO en la pared ventricular y es posible que esté relacionada con la disfunción cardíaca que presentan estos enfermos. Así pues, en la actualidad existen evidencias clínicas y experimentales que permiten afirmar que el NO es un mediador de gran importancia a nivel cardiovascular y pulmonar, en diversos procesos patológicos,

especialmente la sepsis. Frente al papel protector producido por la cNOS existe un efecto perjudicial mediado por la iNOS.

En el páncreas existe una producción basal de NO por el endotelio, mediada por la cNOS, y que actúa como elemento regulador de la secreción exocrina pancreática, mantiene el flujo sanguíneo pancreático y preserva la integridad tisular<sup>215</sup>. También hay evidencias de que la producción de insulina se ve favorecida por niveles bajos de NO pero que este se vuelve tóxico para las células  $\beta$  en cantidades elevadas. El papel del NO en la pancreatitis aún no está claro. La relación entre el NO y la pancreatitis aguda se fundamenta en el papel del NO como elemento regulador del tono vascular y en los procesos inflamatorios mediados por leucocitos. El NO podría ser el elemento común que explicara por un lado las alteraciones de la microcirculación pancreática que condicionan el paso de forma edematosa a necrótica y por otro la acusada infiltración leucocitaria presente en la pancreatitis<sup>216</sup>. Mientras el NO endógeno producido por la cNOS tiene efectos beneficiosos en la pancreatitis, mediante el mantenimiento de la microcirculación pancreática, la sobreproducción generada por la iNOS causa hipoperfusión y lesión tisular. El análisis de los diferentes estudios realizados hasta la fecha induce a creer que, si bien la inhibición de la síntesis de NO por la vía de la cNOS puede agravar la pancreatitis<sup>61</sup>, la inhibición de las grandes cantidades de NO generadas por la iNOS tiene un efecto beneficioso sobre el curso de la enfermedad. En los modelos de pancreatitis experimental leve, como la inducida por ceruleína, la inhibición de la NOS da lugar a la inhibición de la vía constitutiva, que tiene un importante

papel en el mantenimiento de la integridad de la barrera celular endotelial inhibiendo la adhesión leucocitaria por inactivación del anión superóxido<sup>217</sup>, y por tanto en estos modelos el NO tiene un efecto protector frente a la pancreatitis y su inhibición agrava la enfermedad. En los modelos de pancreatitis aguda grave se produce la inducción de la iNOS, cuya inhibición tiene efectos beneficiosos<sup>218</sup>.

#### 1.3.2.2.6 Complemento

El complemento activado promueve la adhesión de los neutrófilos al endotelio. El factor C3a induce la producción de TNF $\alpha$  e IL-1<sup>118</sup>. La fijación del factor del complemento iC3b en el endotelio puede actuar como señal para que los neutrófilos inicien su eclosión oxidativa. El factor de complemento C5a, que actúa mediante unión a receptor específico, es una anafilotoxina y quemoquina que ejerce su acción proinflamatoria aumentando el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular. Además provoca la liberación de enzimas lisosomales y RLO. Este factor es abundante en el lavado broncoalveolar de pacientes con SDRA. Sin embargo, es posible que el C5a y sus receptores participen en ambos procesos pro y antiinflamatorios. En ratones modificados genéticamente sin factor C5a ni su receptor, tras la realización de una pancreatitis aguda con ceruleína, la severidad de la lesión pulmonar asociada era sorprendentemente menor a la de los ratones no modificados. La depleción del complemento puede ejercer un efecto protector sobre la lesión pulmonar, pero no protege a la célula acinar pancreática de las lesiones por pancreatitis<sup>75</sup>. Sin embargo, en otro estudio con un modelo de pancreatitis inducida por dieta, la depleción del complemento no

atenuó los efectos sistémicos de la pancreatitis<sup>129</sup>. Esta discrepancia puede ser debida a la utilización de diferentes modelos de pancreatitis aguda experimental, siendo posible que el complemento participe en la respuesta inflamatoria de la pancreatitis leve y no de la severa.

#### 1.3.2.2.7 *Proteínas de shock térmico*

La observación de que un aumento de la temperatura, unos grados por encima del nivel fisiológico, inducía la síntesis de un pequeño número de proteínas en las glándulas salivares de *Drosophila*, llevó al descubrimiento de un mecanismo universal de protección, empleado por células procariotas y eucariotas para el mantenimiento de su función y homeostasis<sup>219</sup>. La respuesta de shock térmico es un mecanismo celular de defensa muy conservado contra varias lesiones y enfermedades. Se caracteriza por la expresión de un grupo específico de proteínas denominadas proteínas de shock térmico (HSP). Estas proteínas son un grupo de moléculas que se expresan de forma preferente en muchos tipos celulares como respuesta al estrés. La mayoría de ellas ejercen un efecto protector contra la lesión celular. Durante mucho tiempo se creyó que las HSP eran proteínas intracelulares que solo aparecían en el medio extracelular tras condiciones patológicas como la necrosis. Sin embargo, en los últimos años hay evidencias de que esta aparición puede ocurrir en ausencia de necrosis y de que las HSP desarrollan acciones inmunomoduladoras<sup>220</sup>. La expresión de estas moléculas puede inducirse por una gran variedad de estímulos de estrés fisiológico como el calor, los radicales libres de oxígeno, endotoxinas, iones metálicos pesados, algunos aminoácidos, etanol, arsénico, virus o estímulos clínicos como la

hipoxia, los carcinomas o la isquemia<sup>221</sup>, o incluso en situaciones sin estrés, por las prostaglandinas A y J<sup>222</sup>. Estudios experimentales han demostrado que las citoquinas, como la IL-6 inducen la expresión de HSP en el músculo esquelético<sup>223</sup> y otros tejidos<sup>224</sup>.

En condiciones fisiológicas, las HSP suponen entre el 2 y 5% del contenido proteico celular. Estas moléculas se clasifican en 6 grandes familias, atendiendo a su peso molecular expresado en kiloDaltons. Aunque existe una gran homología entre las diferentes HSP de una familia en las diferentes especies estudiadas, no existe una secuencia homóloga entre las diferentes familias. Las **HSP pequeñas** (8-34kDa) se oligomerizan en grandes agregados intracelulares. Entre ellas destacan la *ubiquitina* (8'5 kDa) que participa en la estructuración de la cromatina y degradación de proteínas; la HSP 27 es una proteína citosólica que se transloca al núcleo en situaciones de estrés y participa en la estabilización de microfilamentos. Las **HSP 40** son co-chaperones de las HSP 70, y presentan una función catalítica cargando substratos en las HSP 70. Las **HSP 60** o chaperoninas se han asociado a ciertas enzimas pancreáticas como la amilasa, lipasa y quimiotripsinógeno en su vía secretora, sugiriendo una participación de este grupo de proteínas en el proceso secretor. La cantidad de HSP 60 en los gránulos zimógenos pancreáticos de animales de experimentación aumenta justo antes de la fase de nutrición del ritmo circadiano para disminuir después<sup>225</sup>. Estudios experimentales han demostrado una relación entre estas proteínas y la reducción de la lesión por isquemia-reperfusión en injertos pancreáticos caninos tras la preservación por el método en dos estratos<sup>226</sup>. La familia

de las **HSP 70** son las más conocidas. En concreto la HSP 72, o HSP inducible, es la proteína citoprotectora más estudiada de este grupo. Los miembros de esta familia son proteínas citosólicas que actúan como chaperones, acompañando proteínas de nueva síntesis a través de diversos compartimentos intracelulares, facilitando el paso de proteínas a través de barreras intracelulares, manteniendo la estructura plegada de las proteínas y colaborando en la eliminación de proteínas ensambladas o sintetizadas incorrectamente<sup>227</sup>. Las HSP 70 protegen a las células de la muerte por apoptosis/necrosis que ocurre normalmente tras la exposición a shock térmico, TNF $\alpha$ , estrés oxidativo, ceramidas, drogas antineoplásicas, NO o radiaciones, por inhibición de la liberación del citocromo-c o la despolarización mitocondrial<sup>228,229</sup>. Las **HSP 90** son tres proteínas hidrofóbicas, identificadas en el citoplasma, núcleo y retículo endoplasmático, que constituyen el 1-2% del total de proteínas citosólicas en condiciones normales y se han relacionado con el receptor de hormonas esteroideas. Los niveles de HSP 90 $\alpha$  mRNA se han observado elevados en el adenocarcinoma pancreático<sup>230</sup>. En el lupus eritematoso sistémico se ha observado una correlación de los niveles de IL-6 con la HSP 90 $\beta$ <sup>231</sup>. Por último las **HSP 100** se encuentran en el citoplasma y los nucleolos, participando en la disolución de agregados y facilitando la proteólisis.

La respuesta de shock térmico se ha estudiado a fondo como inductora de termo-tolerancia, pero también ha despertado interés al evaluar su papel en otros procesos como la isquemia cerebral<sup>232</sup> o miocárdica, y la inflamación incluyendo procesos como la sepsis,

pancreatitis o lesión pulmonar. En la pancreatitis aguda experimental inducida por ceruleína, al pretratar a los animales con inmersión en agua caliente o con otros estímulos, existe un aumento en la expresión local de las HSP 70, que ejercen un efecto protector reduciendo la severidad de la afectación glandular, quizás mediante la prevención de la activación del tripsinógeno en la célula acinar. Este fenómeno se relaciona con la colocalización de las hidrolasas lisosómicas y zimógenos digestivos, paso crítico en la activación del tripsinógeno mediado por la catepsina B. La HSP 70 podría actuar bloqueando el tráfico intracelular de enzimas que lleva a la activación de los zimógenos, o bien abortando el incremento del calcio intracelular que sigue a la administración de ceruleína y que es responsable de la redistribución de la catepsina B<sup>233</sup>. Por el contrario, otros autores no han detectado expresión de HSP 70 en el páncreas de animales expuestos a dietas deficientes en colina con suplementos de etionina<sup>234</sup>, si bien sus niveles estaban aumentados en el hígado y permanecían inalterados en pulmón<sup>235</sup>. Dado que la pancreatitis induce una respuesta sistémica, es lógico pensar que la respuesta de shock térmico se active en otros lugares. Así, tras la realización de una pancreatitis aguda experimental con taurocólico se ha demostrado elevación de HSP 72 en pulmón aunque no en el hígado<sup>221</sup>. El oxipurinol y los anticuerpos contra la P-selectina inhiben esta elevación pulmonar de HSP 72, sugiriendo que la misma es mediada por la infiltración a ese nivel por neutrófilos. En un modelo experimental de SDRA, la inducción de un aumento de HSP 70 se ha asociado a menor inflamación y mortalidad, efecto mediado en parte por la inhibición del TNF $\alpha$ <sup>236</sup>.

A modo de resumen, la figura 20 representa una visión en conjunto de la actividad de los diferentes tipos celulares y mediadores proinflamatorios en la pancreatitis aguda.

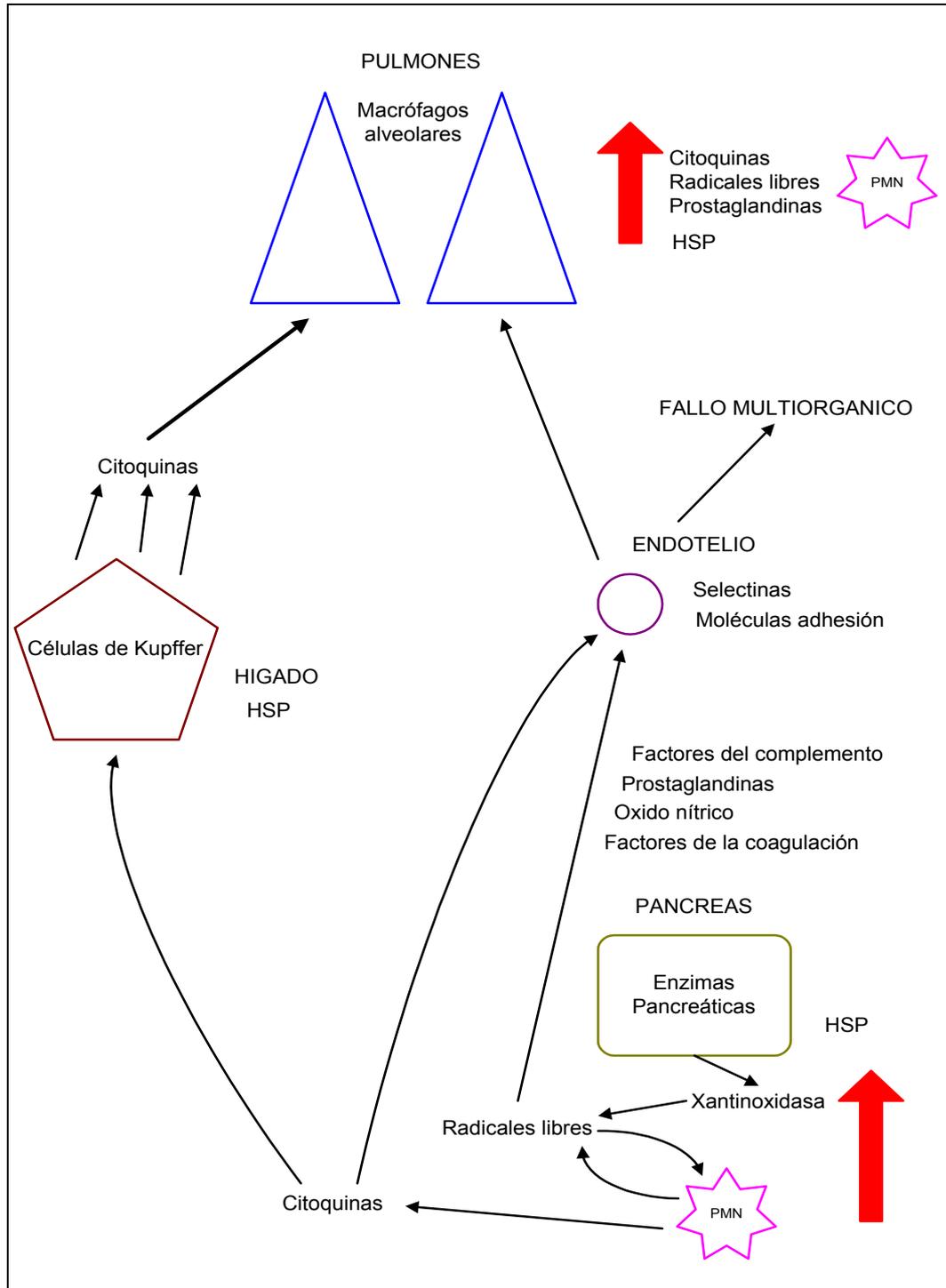


Figura 20. Actividad de células y mediadores proinflamatorios en la pancreatitis aguda

### **1.3.3 Efectos de la pancreatitis aguda sobre el pulmón**

Desde las primeras descripciones clínicas de la pancreatitis aguda se ha puesto de manifiesto la presencia de sintomatología respiratoria, en forma de cianosis, disnea y taquipnea<sup>237</sup>. Sin embargo, hasta la década de 1960, la mortalidad por esta enfermedad la determinaban el shock hipovolémico y la insuficiencia renal, por lo cual, hasta que las mejoras en el conocimiento y terapéutica no consiguieron superar estas complicaciones, no se pudo valorar la importancia y alta incidencia de las complicaciones pulmonares. Aproximadamente el 50-70% de los pacientes con pancreatitis aguda manifiestan al inicio de la enfermedad cierto grado de hipoxemia, aunque solo el 18% presentarán anomalías radiológicas<sup>238</sup>. La evolución desfavorable conlleva la aparición de signos clínicos y radiológicos de insuficiencia respiratoria. En el 15-20% de los pacientes, la lesión pulmonar asociada a la pancreatitis aguda evoluciona aumentando la permeabilidad del capilar alveolar con edema intersticial, hipoxemia arterial, aumento del shunt arteriovenoso, disminución de la capacidad de difusión y de la “compliance” pulmonar. Aunque la insuficiencia respiratoria en el curso de la pancreatitis puede agravarse por la presencia de derrames pleurales, atelectasias, neumonitis, sobre elevación diafragmática por aumento de la presión intraabdominal o colecciones intraabdominales, respiración superficial por dolor abdominal o hipervolemia, los estudios de Warshaw<sup>239</sup> demostraron que el edema pulmonar que aparece en fases finales de la evolución de la enfermedad es el resultado de la rotura de la membrana alveolo-capilar.

### **1.3.3.1 Características morfológicas y funcionales de la lesión pulmonar en la pancreatitis aguda**

Los estudios morfológicos de pacientes fallecidos a consecuencia de pancreatitis aguda e insuficiencia respiratoria reconocen tres fases o grados de afectación en la lesión pulmonar<sup>240</sup>. En una primera fase, entre los días 1 a 7 del inicio de la pancreatitis, se observa edema intersticial e intraalveolar, dilatación de los vasos linfáticos, vasodilatación capilar y adhesión de leucocitos. A partir del tercer día, se observan con frecuencia creciente microtrombos hialinos en los capilares y hemorragias intraalveolares. En una segunda fase, entre los días 8 y 14, aparecen membranas hialinas y la proliferación de pneumocitos. En la fase final, a partir del día 15, aparece fibrosis intersticial, las membranas hialinas se han organizado en tejido fibroso y el epitelio alveolar descamado sufre un proceso de degeneración grasa. En las fases iniciales el diagnóstico de insuficiencia respiratoria es difícil, ya que solo se aprecia un aumento de la frecuencia respiratoria con volúmenes corrientes reducidos. Posteriormente, cuando la capacidad de compensación del paciente se agota, la insuficiencia respiratoria se establece rápidamente. Tanto el curso clínico como los cambios morfológicos encontrados en el curso de la pancreatitis aguda grave son indistinguibles del SDRA.

Los diferentes estudios experimentales que analizan las alteraciones morfológicas del pulmón durante la pancreatitis demuestran que la enfermedad induce la aparición de una importante destrucción de células endoteliales y severo edema pulmonar<sup>241</sup>. Inmediatamente tras la inducción de la pancreatitis se produce una importante proliferación y

marginación de leucocitos polimorfonucleares en el interior de los capilares pulmonares. Posteriormente se observan marcadas alteraciones de las células endoteliales, edema intersticial y engrosamiento de la barrera alveolo-capilar de intercambio gaseoso. Finalmente se produce la destrucción hemorrágica de los pulmones y pérdida completa de la arquitectura alveolar. Estos hallazgos se han confirmado mediante microscopia electrónica, revelándose de forma elocuente la existencia de una lesión muy severa a nivel de la membrana alveolo-capilar. Las células endoteliales presentan rupturas, necrosis focal y separación de la membrana basal. Existe edema intersticial e invasión de células inflamatorias, fundamentalmente neutrófilos. En ocasiones puede apreciarse la ruptura de la propia membrana basal. La lesión endotelial en ratas a las que se indujo una pancreatitis aguda experimental se ha cuantificado mediante estudios morfométricos, hallando un aumento de entre 5 y 6 veces sobre la lesión hallada en grupos control. A las 3 horas de la inducción aumenta entre 5 y 7 veces el número de polimorfonucleares, entre 2 y 3 veces el de macrófagos y entre 5 y 6 veces el de eritrocitos<sup>242</sup>. Esto sugiere que tras la inducción de una pancreatitis experimental a nivel pulmonar se produce un importante reclutamiento de células inflamatorias coincidente con la lesión endotelial y el aumento de la permeabilidad capilar. Estos cambios morfológicos expresan el aumento de la permeabilidad vascular y se traducen funcionalmente interfiriendo el intercambio gaseoso y alterando la relación ventilación-perfusión, dando lugar a hipoxemia.

En resumen, los hallazgos morfológicos pulmonares, tanto clínicos como experimentales, ponen de manifiesto que durante una pancreatitis aguda, a nivel pulmonar se produce: 1) acumulación y marginación de leucocitos polimorfonucleares, 2) destrucción de las células endoteliales capilares, 3) aumento de la permeabilidad vascular, 4) edema intersticial, 5) destrucción de la estructura alveolar y 6) hemorragia intraalveolar.

Los estudios referentes al funcionalismo pulmonar en el curso de la pancreatitis aguda experimental son escasos. Se han observado un descenso en la “compliance” pulmonar asociado a un aumento del peso<sup>243</sup> y un descenso en los volúmenes pulmonares junto a un aumento del número de células inflamatorias del lavado bronco-alveolar. También se ha constatado un aumento de la elasticidad dinámica pulmonar y una tendencia al aumento tanto de la relación presión-volumen como de la resistencia tisular<sup>244</sup>. Todo ello sugiere que las lesiones principales que la pancreatitis aguda experimental induce sobre el pulmón se producen a nivel distal de la vía aérea y no a niveles altos de las vías respiratorias. El análisis morfométrico de las vías respiratorias periféricas ha confirmado el aumento en el índice de contracción de estas vías, lo que parece ser la causa de la distribución desigual del aire inspirado, favoreciendo la aparición de cambios regionales de la relación presión-volumen y en consecuencia, el aumento de la elasticidad dinámica pulmonar. El estudio histológico, que siempre acompaña el análisis funcional en estas investigaciones, confirma el aumento de la permeabilidad vascular y la infiltración por células inflamatorias, así como la presencia de edema

alveolar. Sin embargo constatan un cierto retraso entre las alteraciones histológicas y la aparición de disfunciones clínicamente relevantes.

### **1.3.3.2 Patogénesis de la lesión pulmonar inducida por la pancreatitis aguda**

Los mecanismos que unen la lesión pancreática y la inflamación pulmonar son complicados y se han estudiado extensamente. Ningún gen, molécula, célula o sistema puede explicar por si solo los complejos mecanismos fisiopatológicos que subyacen a esta enfermedad. El desconocimiento de los procesos fisiopatológicos que unen pancreatitis aguda e insuficiencia respiratoria hacen que el tratamiento de esta complicación se limite a ser de soporte o mantenimiento de las funciones hasta la recuperación espontánea. Diferentes líneas de investigación sobre la patogénesis de la lesión pulmonar en la pancreatitis aguda han sugerido múltiples mecanismos que podrían estar implicados. La mayoría de estas hipótesis condicionan la aparición de la lesión pulmonar a la acción de un intermediario que tras su activación en el páncreas desencadena diferentes efectos sistémicos. Algunos mediadores circulatorios pueden estar implicados en estos efectos sistémicos de la pancreatitis, entre ellos la xantina oxidasa, el TNF $\alpha$ , el complemento activado, la fosfolipasa A<sub>2</sub> o la elastasa, pero no la amilasa, lipasa o tripsina<sup>245</sup>.

Por otra parte, un patrón similar de alteraciones respiratorias se puede encontrar en modelos experimentales de sepsis inducida por endotoxinas o bacterias. En estos modelos se detecta una elevación de los niveles plasmáticos de citoquinas y otros mediadores de origen

hepático. A través de estos modelos experimentales se ha podido observar que la activación de las células inflamatorias del hígado, especialmente las células de Kupffer, tiene un papel clave en el desarrollo de las lesiones pulmonares y el fracaso multisistémico producido por la administración de endotoxinas<sup>246</sup>. En el caso de la pancreatitis aguda, el hecho de que la mayoría de los enzimas pancreáticos y los mediadores liberados a la circulación pasen a través del hígado antes de diluirse en la circulación sistémica ha sugerido que este paso pueda ser determinante para el desarrollo de la lesión pulmonar.

Una de las primeras hipótesis que surgieron para explicar las alteraciones respiratorias en la pancreatitis aguda y que todavía se encuentra sometida a investigación, implicaba la acción de las proteasas liberadas por el páncreas inflamado a la circulación sistémica<sup>247</sup>. Esta acción se atribuyó a la actividad fosfolipasa, ya que se suponía que el colapso pulmonar debía ser secundario al descenso de la actividad del surfactante y se había observado que tanto la inhibición de la síntesis de los fosfolípidos pulmonares<sup>248</sup>, como el aumento de la degradación de las lecitinas pulmonares por determinadas fosfolipasas podían ocasionar este descenso del surfactante<sup>249</sup>. Además, la instilación de fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) a nivel pulmonar produce edema alveolar, acumulación de células inflamatorias, alteración del intercambio gaseoso y alta mortalidad<sup>250</sup>. La FLA<sub>2</sub> participa de forma determinante en muchos procesos inflamatorios por su acción directa sobre las membranas celulares, como mediador de la síntesis de otros productos proinflamatorios y por su acción como segundo mensajero intracelular. La activación de esta enzima refleja el

desencadenamiento de procesos hidrolíticos por parte de proteasas contenidas por las células pancreáticas, como la tripsina. Se ha sugerido que la FLA<sub>2</sub> pancreática, liberada a la circulación como resultado de la destrucción de las células pancreáticas, podría ser la responsable de las alteraciones funcionales de los diversos órganos<sup>55</sup>. Sin embargo, la fuente celular de FLA<sub>2</sub> en los pacientes con pancreatitis aguda no ha sido determinada y existen evidencias de que los niveles plasmáticos de estos pacientes muestran diferencias en cuanto a inmunorreactividad con la FLA<sub>2</sub> catalíticamente activa<sup>251</sup>. Además su perfil de actividad difiere del de otras enzimas pancreáticas como la tripsina, la amilasa o la lipasa. Por otra parte, otras investigaciones han demostrado una diferencia importante en los perfiles de lipasa y FLA<sub>2</sub> tras la inducción de una pancreatitis. Mientras la lipasa alcanza su pico máximo en la primera hora de la inducción, el aumento de la FLA<sub>2</sub> se produce de forma tardía, a partir de las 4-6 horas de la inducción<sup>252</sup>. Esto sugiere un origen no pancreático del incremento de la actividad FLA<sub>2</sub>. Además, estas investigaciones no pudieron detectar actividad enzimática cuando previamente a la inducción de la pancreatitis aguda experimental se había realizado un shunt porto-cava, por lo que se infería que el incremento de la actividad FLA<sub>2</sub> plasmática depende del paso a través del hígado de sustancias liberadas por el páncreas inflamado<sup>84</sup>. La realización del shunt porto-cava previamente a la realización de la pancreatitis da lugar a que las sustancias liberadas por el páncreas lleguen al hígado tras su dilución en todo el sistema circulatorio, y esto parece ser suficiente para prevenir o retrasar la aparición de la actividad FLA<sub>2</sub> plasmática. Todo este proceso

confiere al hígado un papel activo y de importancia no bien conocida en el desarrollo de las lesiones pulmonares y sistémicas asociadas a la pancreatitis aguda, y además cuestiona si la FLA<sub>2</sub> tiene realmente alguna función en los primeros momentos del desarrollo de la enfermedad.

Al observar preparaciones histológicas pulmonares tanto de pacientes como de animales de experimentación con pancreatitis aguda severa e insuficiencia respiratoria se pone claramente de manifiesto, desde fases iniciales, la existencia de un importante infiltrado celular inflamatorio fundamentalmente formado por polimorfonucleares, edema e hiperemia que condicionan el colapso de los alveolos. Estos hallazgos implican que se produce un quimiotactismo de los neutrófilos a los pulmones y un aumento de la permeabilidad vascular pulmonar. Existen varios mecanismos que supuestamente pueden atraer los neutrófilos a los pulmones. Entre ellos la activación del complemento y formación de derivados, especialmente el factor C5a<sup>75</sup>. Sin embargo, en los últimos años existen evidencias crecientes de que ciertos factores derivados de los macrófagos alveolares ejercen un poder quimiotáctico superior<sup>129</sup>. Por otra parte, la elastasa pancreática es un potente estimulador del secuestro pulmonar de neutrófilos, induciendo además edema intersticial e intraalveolar, y hemorragia extravascular. Este efecto ha podido comprobarse en estudios experimentales mediante la inoculación sistémica de la enzima<sup>253</sup>, aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual ésta alcanza los pulmones, pudiendo ser a través de la inflamación peripancreática, los canales linfáticos retroperitoneales o los drenajes venosos portal y sistémico del páncreas<sup>52</sup>.

La implicación de los neutrófilos en la patogenia de la lesión pulmonar en la pancreatitis aguda se ha estudiado mediante histología, determinación de mieloperoxidasa, depleción de neutrófilos y administración de anticuerpos anti-neutrófilos<sup>75,254</sup> en animales de experimentación. En todos los estudios se evidencia un acúmulo manifiesto de neutrófilos a nivel pulmonar en el curso de la pancreatitis y sugieren que la lesión pulmonar está mediada por la actividad de los mismos porque su depleción o bloqueo previene la aparición de las lesiones.

Una vez reclutados los neutrófilos en el pulmón, la lesión tisular se produce por varios mecanismos. Estos incluyen la liberación de enzimas lisosomales y el estrés oxidativo mediante la generación de RLO ( $O_2\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ) en cantidad capaz de exceder la capacidad secuestradora de la SOD y la catalasa, provocando daño en el parénquima pulmonar y fundamentalmente en las células endoteliales por destrucción de su membrana basal. Ello viene refrendado por estudios experimentales que demuestran que el tratamiento de animales con enzimas antioxidantes protege de la lesión pulmonar<sup>75</sup>. La generación de RLO parece ser también esencial para aumentar la adherencia entre los neutrófilos y las células endoteliales, y para la infiltración de los espacios alveolares por células inflamatorias.

La actividad de los neutrófilos también se ha asociado a la puesta en marcha del metabolismo del ácido araquidónico en la pancreatitis aguda experimental, tanto por la vía de la ciclooxigenasa, cuyos elementos con excepción del tromboxano no son “*per se*” especialmente

proinflamatorios, como por la vía de la lipooxigenasa, que sí genera un gran número de agentes proinflamatorios. Producto de esta última vía es el leucotrieno B<sub>4</sub>, potente agente quimiotáctico de neutrófilos que a nivel pulmonar produce constricción de las vías aéreas e interactúa con las prostaglandinas vasodilatadoras para producir un aumento de la permeabilidad vascular. El nivel de prostanoïdes en pulmón aumenta de forma significativa tras 12 horas de la inducción de una pancreatitis. Si este hecho se valora conjuntamente con un aumento del edema local, todo ello sugiere la activación de mecanismos inflamatorios. Los cambios observados en la prostaciclina (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) y los metabolitos del tromboxano B<sub>2</sub> generados por células endoteliales y plaquetas respectivamente, sugieren alteraciones en la microcirculación y pueden ser indicadores de inflamación en el tejido pulmonar. Por otra parte, un estudio experimental observa niveles disminuidos de prostanoïdes en pulmón a las 6 horas de la inducción de la pancreatitis<sup>84</sup>. Ello podría suponer la presencia de un inhibidor endógeno de los eicosanoïdes, y en concreto podría tratarse de la IL-6, citoquina de acción retardada que ejerce un efecto inhibitorio en ciertos prostanoïdes. Las modificaciones en los niveles de eicosanoïdes detectadas a nivel pulmonar se evitan cuando antes de inducir la pancreatitis aguda experimental se realiza un shunt porto-cava, lo que significa que también en este aspecto de la respuesta inflamatoria tras una pancreatitis, el hígado desempeña alguna función. Sin embargo, no se conocen con exactitud las alteraciones pulmonares de los prostanoïdes en las fases más iniciales de la pancreatitis aguda y si el LTB<sub>4</sub> desempeña realmente una función como agente quimiotáctico de

neutrófilos en el desarrollo de la lesión pulmonar por la pancreatitis aguda. En un reciente estudio experimental, los niveles pulmonares de LTB<sub>4</sub> no se modificaron tras la inducción de una pancreatitis aguda, lo que pone en duda el papel del metabolismo de la 5-lipooxigenasa del ácido araquidónico en el proceso inflamatorio pulmonar secundario a la pancreatitis aguda<sup>255</sup>.

Las similitudes entre el fracaso pulmonar y multiorgánico que aparecen en la pancreatitis aguda severa y el que surge en otras situaciones como la sepsis, traumatismos o grandes quemados ha hecho surgir la hipótesis de que son los mediadores de la respuesta inflamatoria sistémica, que están muy aumentados en estas situaciones, los que provocan la activación de las células inmunológicas de los órganos a distancia y que la sobre-estimulación o respuesta incontrolada de estas células daría lugar a las lesiones titulares que inducirían al fracaso de los diferentes órganos. Los mediadores de la inflamación serían así el nexo de unión entre la lesión pancreática, un proceso aparentemente local, y la lesión de los órganos a distancia que hacen de este proceso una enfermedad sistémica.

En la actualidad existen bastantes evidencias de que mediadores proinflamatorios como el TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-2 o IL-10 están aumentados en la pancreatitis aguda<sup>108,256</sup>. La lesión pancreática produce y libera gran cantidad de citoquinas a la circulación sistémica que pueden activar células inflamatorias circulantes que serán secuestradas por la microvasculatura pulmonar. Estas citoquinas pueden también alcanzar el pulmón a través de la ascitis pancreática o conductos linfáticos<sup>74</sup>. Sin

embargo, durante la pancreatitis aguda experimental, la producción extrapancreática de citoquinas sigue un patrón temporal diferente y organoespecífico. Los niveles de citoquinas producidas en pulmón son superiores a los hallados en suero, mientras en otros órganos como riñones, corazón o cerebro no se producen, sugiriendo que son las células residentes, más que los neutrófilos circulantes, la fuente de citoquinas<sup>52</sup>.

Las investigaciones que implican a los neutrófilos en las lesiones pulmonares de la pancreatitis han dado lugar a estudios sobre otras sustancias que regulan la interacción de los neutrófilos y el endotelio vascular. Se ha sugerido que la alteración vascular pulmonar, que cursa con aumento de la permeabilidad y formación de edema, puede ser secundaria a la acción de los neutrófilos activados. En este sentido, el óxido nítrico (NO) se ha mostrado como un mediador de gran importancia ya que es capaz de tener un efecto vasodilatador local y de inhibir la adherencia de los neutrófilos al endotelio o la síntesis de superóxido. Estas investigaciones resultan controvertidas, ya que por un lado se atribuye al NO un efecto protector al inhibir la infiltración pulmonar de los neutrófilos<sup>257</sup>, y por otro un efecto citotóxico resultado de la activación de la vía de la iNOS de las células inflamatorias y ser segregado en cantidades masivas<sup>258</sup>.

Otras moléculas involucradas en la relación neutrófilos-endotelio son las moléculas de adhesión. Un estudio reciente empleando anticuerpos monoclonales ha demostrado que la pancreatitis induce un aumento de la expresión de la P-selectina en pulmón, y que este parece ser mediado por radicales libres generados por la vía dependiente de la

xantinoxidasa liberada por el páncreas lesionado<sup>66</sup>. El mismo estudio indica que la ICAM-1 no sufre modificaciones a nivel pulmonar tras el estímulo de la pancreatitis, si bien esta molécula se expresa de forma constitutiva en pulmón a niveles elevados, por lo que no se descarta su participación en el reclutamiento de neutrófilos. Por otra parte, al emplear animales con deficiencia de ICAM-1, la pancreatitis experimental genera menor lesión pulmonar si bien no afecta el grado de lesión en el páncreas<sup>259</sup>.

La participación de la XOD pancreática como inductora de lesión pulmonar en la pancreatitis ha sido ampliamente estudiada. Esta enzima es una fuente de estrés oxidativo cuyo origen durante la pancreatitis no ha sido bien establecido, aunque se sugiere que las células pancreáticas lesionadas pueden ser fuente de la misma<sup>62</sup>. Sanfey reveló el valor de los inhibidores de la XOD para reducir la lesión pancreática en tres modelos diferentes de pancreatitis aguda<sup>260</sup>. En fases tempranas de la pancreatitis, la XOD liberada en la circulación sistémica actúa generando RLO y promoviendo el reclutamiento de neutrófilos. Las células del endotelio pulmonar son extremadamente sensibles a este efecto. Sin embargo, un estudio empleando heparina, sustancia que interfiere en la unión de la XOD al endotelio y moviliza las reservas de XOD, demuestra que tras la inducción de una pancreatitis, la administración de heparina provoca un aumento en la actividad MPO pulmonar que se correlaciona con un aumento de actividad XOD, pero este efecto no se aprecia en el grupo control al administrar la heparina. Ello implica que el aumento de la actividad XOD plasmática no es, por sí solo, capaz de inducir un proceso

inflamatorio en pulmón<sup>157</sup>. Una posible explicación a este hecho es que en el grupo control faltaría el sustrato para la enzima, puesto que la heparina aumenta la actividad XOD sin afectar la concentración sanguínea de xantina e hipoxantina, sustancias producto del catabolismo de las purinas liberadas por la célula pancreática lesionada. La especial sensibilidad de los pulmones a los efectos de la XOD podría deberse a la presencia de altas concentraciones de oxígeno molecular libre (no unido a hemoglobina, como ocurre en la sangre), necesario para catalizar las reacciones de la XOD<sup>261</sup>.

La proteína asociada a la pancreatitis (PAP) es un polipéptido secretor de 16'6 kDa descrito por Keim<sup>262</sup> en 1984, no detectable en páncreas sano pero muy elevado en pancreatitis a partir de las 6 horas de la inducción, y que supone hasta el 5% de las proteínas secretadas por el páncreas enfermo. Algunos estudios demuestran que la supervivencia de los animales tras la pancreatitis experimental mejora al inducir una respuesta pancreática al estrés, que implicaría una sobre expresión de PAP<sup>263</sup>. Recientemente un estudio ha implicado a la PAP en la inflamación pulmonar tras la pancreatitis aguda<sup>245</sup>. Ello ocurre al inocular altas dosis de PAP en la circulación, lo que provoca una sobreproducción hepática de TNF $\alpha$ , como producto de una respuesta del hepatocito al estrés inducido por la PAP sugerido por una elevación concomitante de la HSP70, más que como consecuencia de la inflamación, ya que no se aprecian cambios en la actividad MPO, ni activación de la P-selectina y las células de Kupffer permanecen quiescentes. Por lo tanto, parece ser que bajas concentraciones de PAP actúan como protectoras frente al

estrés celular, mientras que altas concentraciones como las observadas en la pancreatitis pueden inducir efectos nocivos.

La compleja cascada de inmunoactivación en la pancreatitis aguda no se limita a la inmunidad humoral, sino que los linfocitos se hallan involucrados en la lesión local pancreática tanto como en la lesión sistémica<sup>264</sup>. La lesión pulmonar en la pancreatitis aguda es un campo de investigación en plena actividad donde se implican, como hemos visto, diversos mediadores de la inflamación y células del sistema inmunológico. Ello explica porque los intentos terapéuticos mediante el bloqueo de un solo mediador han fracasado hasta la fecha. Las cuestiones de mayor importancia en la actualidad son averiguar que mediadores actúan como detonantes de la respuesta sistémica y a partir de que células son liberados.

#### **1.3.4 Importancia del hígado en los efectos sistémicos de la pancreatitis aguda**

La medición a nivel hepático de diversas sustancias relacionadas con el proceso inflamatorio sistémico provocado por la pancreatitis aguda en otros órganos como el pulmón, demuestra que el hígado no participa como órgano diana de la respuesta inflamatoria. Los niveles de prostanoïdes en hígado tras la inducción de una pancreatitis aguda se muestran básicamente inalterados, si bien existe una disminución transitoria de los niveles de TXB<sub>2</sub>. En concordancia con ello, estudios experimentales han mostrado que el hígado es el órgano donde menores cantidades de malonildialdehido se forman tras la pancreatitis<sup>155</sup>

traduciendo escasa lipoperoxidación. Tampoco existe aumento hepático de la actividad SOD. Los niveles de MPO se muestran inalterados, traduciendo la inexistencia de un infiltrado inflamatorio. Por otro lado, estudios sobre metabolismo en la pancreatitis aguda no han demostrado cambios en las concentraciones de glucosa o lactato o del índice lactato/piruvato a nivel hepático, mostrando un metabolismo energético inalterado a las tres horas de la inducción de la pancreatitis, contrario a lo que ocurre en el páncreas o la pared intestinal<sup>80</sup>. Sin embargo, si existe cierto grado de estrés oxidativo, traducido por la disminución de los niveles de glutathion reducido. Esto podría ser debido a la acción de la xantina y XOD, que estimularía el hígado a generar mediadores proinflamatorios, pero el hecho de que el oxipurinol, inhibidor conocido de la XOD, no revierta completamente este efecto, sugiere que podrían existir otras fuentes de RLO<sup>62</sup>.

Desde el punto de vista histológico, tras la inducción de una pancreatitis, a microscopía óptica en el hígado no se observan cambios en el parénquima y únicamente aparece una discreta perihepatitis, probablemente consecuencia del proceso inflamatorio desencadenado por vecindad en el páncreas y peritoneo. No se aprecia formación de edema local<sup>84</sup>. Todo ello descarta la aparición de un proceso inflamatorio local hepático tras la génesis de una pancreatitis aguda experimental, lo que denota una mayor resistencia del hígado, en comparación con otros órganos, para hacer frente a la lesión sistémica inducida por la pancreatitis. En otros estudios, sin embargo, la microscopía electrónica

demuestra lesiones hepatocelulares y especialmente en las células de Kupffer<sup>73</sup>.

A pesar de todo, es conocido que en el fallo multiorgánico posterior a una pancreatitis clínica, la disfunción hepática es un aspecto importante. En otros modelos experimentales se ha demostrado que la lesión hepática aparece en fases tardías de la pancreatitis<sup>265</sup>. Alteraciones del contenido de RNA y DNA de los hepatocitos pueden detectarse entre 24 y 48 horas tras la inducción de la pancreatitis. También se han demostrado alteraciones en la función lisosomal y mitocondrial de las células hepáticas a las 12 horas de la inducción<sup>266</sup>. Aún así, la lesión hepática asociada a la pancreatitis no parece debida a un mecanismo inflamatorio.

Diversos estudios experimentales sugieren que el hígado participa de forma activa en la génesis de la respuesta inflamatoria sistémica a la pancreatitis. La implicación del hígado viene apoyada por el hecho de que la mayor parte de la sangre procedente del páncreas, y por tanto los mediadores y metabolitos liberados durante la pancreatitis, alcanza el hígado a través de la vena porta, siendo este el primer órgano de la economía que recibe los citados mediadores. Grewal realiza uno de los primeros estudios que evaluó esta implicación hepática en la respuesta sistémica a la pancreatitis<sup>267</sup> determinando el nivel de TNF $\alpha$  en sangre procedente de la vena porta, vena hepática y arteria femoral. Mientras en vena porta y arteria femoral los niveles de TNF $\alpha$  eran elevados, en la vena hepática, que recoge la sangre a la salida del hígado, los niveles de mediador estaban significativamente disminuidos. Esto sugiere que en el hígado se produce una degradación de la citoquina, pero la elevación

detectada en arteria femoral sugiere la existencia de otra fuente de producción de TNF $\alpha$  en el curso de la pancreatitis, que podría ser el pulmón. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los cuales se ha señalado una reducción del 31% del TNF marcado radiactivamente tras su paso por el hígado en un modelo de shock séptico<sup>268</sup>. Por el contrario, en un estudio posterior, Gloor muestra unos niveles de citoquinas más elevados a nivel de la vena hepática y en la circulación sistémica que en la vena porta<sup>115</sup>. La razón de esta discrepancia entre ambos estudios no es clara. Este estudio también sugiere que hay una producción extrapancreática de citoquinas, que podría ocurrir a nivel hepático y postula que son las células de Kupffer hepáticas las responsables de la sobreproducción de citoquinas en la vena hepática tras la pancreatitis. Esta aseveración la demuestra mediante el tratamiento, previo a la inducción de la pancreatitis, de un grupo de animales con cloruro de gadolinio, agente que bloquea las células de Kupffer. En este grupo de animales los niveles de citoquinas a nivel de vena hepática y porta no muestran diferencias y así mismo la respuesta sistémica pulmonar se halla atenuada. Bautista investigó los efectos de una dosis no letal de TNF $\alpha$  en un modelo aislado de perfusión hepática en la rata, hallando que el TNF $\alpha$  actuaba selectivamente sobre las células de Kupffer y no sobre hepatocitos, células endoteliales hepáticas y neutrófilos hepáticos o circulantes para provocar la liberación de anión superóxido<sup>113</sup>. Otros estudios han hallado producción hepática de citoquinas tras su producción en el páncreas inflamado<sup>108</sup> y en la misma línea demuestran que la elastasa pancreática induce la producción de

TNF en las células de Kupffer vía la activación del NF- $\kappa$ B y que este TNF es el responsable de la ulterior lesión hepatocitaria y pulmonar<sup>114</sup>. Las células de Kupffer son pues un objetivo de los mediadores que alcanzan el hígado y también una fuente de sustancias nocivas que contribuye al desarrollo de la respuesta sistémica en la pancreatitis aguda.

Recientes estudios experimentales demuestran que la sobreproducción de mediadores de origen hepático derivados de los macrófagos titulares, como el TNF, IL-1 $\beta$  o NO causan lesiones hepatocelulares y a nivel pulmonar. Es conocido el efecto citotóxico del TNF sobre el hepatocito, por la inhibición "*in vitro*" de la respiración mitocondrial hepatocitaria o la inducción de la apoptosis celular. La prevención de la producción de estos mediadores mediante la pacificación de los macrófagos atenúa la lesión hepatocelular<sup>112</sup> pero no la elimina completamente, lo que sugiere que existen otros mecanismos lesivos, como la apoptosis inducida por la ascitis pancreática mediada por la p38 proteinquinasa activada por mitógenos (p38-MAPK) y la caspasa-3<sup>85</sup>.

Otras evidencias a favor de la participación del hígado en la potenciación de la cascada inflamatoria en la pancreatitis surgen de la realización de un shunt porto-cava previo a la pancreatitis, causando la derivación de la sangre portal procedente del páncreas e impidiendo su paso a través del hígado y provocando una serie de cambios en la respuesta sistémica a nivel pulmonar<sup>255</sup>. No se produce el aumento en la MPO pulmonar característico de la pancreatitis, reflejando la ausencia de infiltrado inflamatorio. Ello induce a pensar que el hígado está implicado en la liberación de algún agente con poder quimiotáctico pulmonar, bien

directamente o a través de la estimulación de los macrófagos alveolares. El shunt porto-cava también previene el aumento de síntesis de prostaciclina y TXB<sub>2</sub> inducido en pulmón por la pancreatitis, así como el aumento de FLA<sub>2</sub> en plasma o el descenso pulmonar de la SOD<sup>84</sup>. Sin embargo, la realización del shunt conlleva cambios y alteraciones funcionales hepáticas, la mayoría de aparición tardía como elevación de las GOT y LDH, o niveles altos de eicosanoides (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), y necrosis del parénquima hepático de localización preferentemente centrolobulillar. Esta lesión también aparece en los animales con shunt porto-cava sometidos a pancreatitis. Además, se producen alteraciones hemodinámicas que podrían ser responsables de la disminución del edema pulmonar tras la inducción de pancreatitis. En cualquier caso, el modelo de shunt porto-cava implica la idea de que los mediadores inflamatorios generados por la pancreatitis podrían ser específicos para determinadas células hepáticas, ya que su llegada directa al pulmón a través del shunt no estimula la inflamación pulmonar.

Tras lo expuesto en esta sección, aún se necesitan más estudios para clarificar el papel exacto del hígado en los cambios pulmonares inflamatorios asociados a la pancreatitis aguda.

## **1.4 Modelos experimentales de inflamación pancreática / pancreatitis aguda**

La inaccesibilidad del páncreas humano durante las fases tempranas de la pancreatitis aguda, ha provocado que la mayor parte del conocimiento fisiopatológico de la enfermedad se deba a estudios experimentales. El primer modelo de pancreatitis aguda puede atribuirse a Bernard, que en 1856 indujo la pancreatitis por inyección de bilis y aceite de oliva en el conducto pancreático de un perro<sup>123</sup>. En las últimas décadas se han desarrollado, en diferentes especies animales, diversos modelos de pancreatitis experimental, incluyendo la inmunológica, la inducida por secretagogos, la inducida por dieta, o por ligadura del conducto pancreático, o mediante inyección intraductal de sustancias, o por lesión microvascular, y todos ellos han contribuido al mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y en la búsqueda de opciones terapéuticas.

Generalmente, estos modelos difieren en el resultado de la pancreatitis que producen, así como en la relevancia clínica o patogénica respecto a la pancreatitis humana. Sin embargo, no existe un modelo perfecto que recreé la enfermedad humana. Algunos agentes, empleados comúnmente para la producción de una pancreatitis aguda experimental, como la ceruleina o la dieta deficiente en colina, o los suplementos de etionina, no causan pancreatitis en humanos. Así mismo, los modelos basados en la inyección de bilis se basan en el efecto detergente del ácido, ya que la bilis por si sola no activa los zimógenos. Recientemente

se han estudiado las diferencias según el tipo de muerte de la célula acinar que producen los distintos modelos de pancreatitis. Así, la apoptosis es el hecho predominante en los modelos que presentan formas leves de la enfermedad, como la ceruleina, la ligadura ductal en ratas o la isquemia-reperfusión, mientras que la necrosis es característica de formas graves como la deficiente en colina o la inducida por taurocólico<sup>207</sup>.

Todos estos modelos son simples herramientas de la investigación, para ayudar en el conocimiento de los fenómenos ocurridos en la iniciación y progreso de la pancreatitis. Hoy en día existen dos grandes grupos de modelos experimentales en pancreatitis aguda: 1) las técnicas “ductales”, que intentan explicar la fisiopatología de la pancreatitis como secuela de una obstrucción del conducto pancreático, bien sea por reflujo biliar, obstrucción-hipersecreción o reflujo duodenal y las técnicas “celulares”; y 2) las técnicas “celulares” en los que la activación enzimática se origina dentro de la propia célula acinar. Otros modelos experimentales, no incluidos en estos grupos, incluyen el páncreas aislado, perfundido *ex vivo*, la pancreatitis autoinmune y la isquemia-reperfusión pancreática.

## **1.4.1 Modelos ductales de pancreatitis aguda**

### **1.4.1.1 Modelo de infusión ductal retrógrada**

El modelo de infusión retrógrada de sal biliar (**taurocolato sódico**) en ratas es uno de los más estudiados. Reproduce el reflujo de bilis al conducto pancreático que se produciría por la obstrucción a nivel ampular.

Este método requiere anestesia general, laparotomía y canulación del conducto pancreático a través del borde antimesentérico del duodeno. El modelo de pancreatitis por taurocolato reproduce los cambios morfológicos y fisiológicos de la forma más severa de la enfermedad humana<sup>269</sup>.

La gravedad y mortalidad de la pancreatitis inducida por el ácido taurocólico depende de la concentración, volumen y cantidad de sal biliar administrada así como de la presión de infusión. De este modo, la infusión de taurocolato al 3% (0'2 ml/ 100 gr de peso corporal) causa una mortalidad del 8% en las primeras 24 horas y del 25% en las primeras 72 horas. Si la concentración es del 4'5% la mortalidad asciende hasta un 72% en las primeras 24 horas y si es del 5% la mortalidad es del 82% en las primeras 24 horas y del 100% en las primeras 31 horas<sup>270</sup>. Sin embargo, pese a estas diferencias en mortalidad, el grado de lesión pancreática producido por el taurocolato sódico al 3 o al 5% no difiere de forma significativa. La diferencia parece radicar en el mayor grado de actividad mieloperoxidasa a nivel pulmonar<sup>155</sup>.

El taurocolato produce una elevación inmediata de las prostaglandinas, por su efecto sobre la estabilidad de la membrana<sup>176</sup>. Entre los hallazgos histológicos destacan cambios macroscópicos como el edema pancreático, hemorragia, necrosis pancreática y peripancreática, así como formas exudativas peritoneales macro y microscópicas. El hecho que caracteriza este modelo de pancreatitis es la disrupción de las membranas y destrucción de la célula acinar, lo que indica que enzimas

proteolíticas activadas como la tripsina pueden ser responsables de una elevación en la XOD<sup>130</sup>.

La pancreatitis aguda experimental también puede inducirse por la inyección retrograda de otras sustancias, como la **lisolectina** al 0'8%. Este procedimiento siempre se acompaña de una severa necrosis del parénquima pancreático, ascitis hemorrágica y necrosis grasa intraabdominal. Histológicamente, a los 30 minutos de la inducción se observa una necrosis parcheada del páncreas con marcado edema intersticial. La necrosis se expande y se asocia a hemorragia e infiltrado inflamatorio hacia las 60 horas. A las 72 horas se produce un remplazo de la necrosis por fibroblastos, la neogénesis del epitelio ductal y la formación de estructuras similares a acinos. Entre los cambios que aparecen en órganos extrapancreáticos con este modelo destacan los del pulmón, donde a las 12 horas se aprecian micro y macroatelectasias, edema e infiltración celular de la pared alveolar y estrechamiento de los bronquiolos. En este modelo de pancreatitis, la supervivencia es del 50% en las primeras 48 horas y del 30% en 72 horas<sup>271</sup>.

#### **1.4.1.2 Modelo de obstrucción ductal / hipersecreción**

La simple ligadura del conducto pancreático produce atrofia del tejido acinar y la estimulación concomitante con secretina produce además un edema pancreático y necrosis grasa con aumento de la presión intraductal y aparición de enzimas pancreáticos en los linfáticos y vasos sanguíneos que drenan el páncreas.

El grado de lesión producido por este modelo de pancreatitis depende de la especie animal a la que se aplique, así en la rata resulta en

una forma relativamente leve de pancreatitis mientras en la zarigüeya resulta letal. La diferencia estriba en el tipo de muerte celular que causa el modelo en los dos animales. Mientras en la rata se produce básicamente apoptosis, el grado de necrosis de la célula acinar de la zarigüeya es mucho más elevado<sup>272</sup>.

Actualmente, este modelo se utiliza poco para el estudio de la pancreatitis aguda. Dado que la obstrucción ductal por periodos prolongados de tiempo conduce a una importante pérdida del tejido acinar y fibrosis, parece un modelo más útil para el estudio de la pancreatitis crónica obstructiva<sup>273</sup>.

#### **1.4.1.3 Modelo de ligadura duodenal**

Descrito por primera vez por Seidel en 1910, este modelo fue diseñado con la idea de manipular lo mínimo el páncreas y reducir el trauma quirúrgico que se produce en los modelos de inducción ductal retrógrada. Se ha utilizado en perros, observando un edema pancreático a las 4 horas, pequeñas áreas de hemorragia en la cabeza pancreática las 9 horas en toda la glándula pasadas las 11 horas. Para explicar la lesión pancreática hay varias hipótesis, desde que es el resultado de una lesión vascular o la afectación de una vasculitis hasta que la sobredistensión del duodeno puede condicionar el reflujo duodenal, que contiene enzimas activados, al conducto pancreático. Este modelo puede aplicarse a otros animales, como la rata, pero existen dudas de su validez para el estudio de la pancreatitis aguda ya que se ha observado necrosis de la pared duodenal y sepsis peritoneal y pancreática asociada a bacteriemia, incluso en pancreatitis de grado leve, y este hecho no es típico de la

pancreatitis aguda humana. Pese a ello se ha aplicado para estudiar el efecto de los glucocorticoides en la pancreatitis aguda<sup>274</sup>.

#### **1.4.1.4 Modelo de perfusión ductal**

Este modelo fue descrito por Reber en 1979 en gatos y precisa la canulación del conducto pancreático tanto en la cabeza como en la cola de la glándula.

La barrera mucosa del conducto pancreático normalmente previene la difusión de  $\text{HCO}_3^-$  del jugo pancreático a la corriente sanguínea. El flujo de aniones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  se puede determinar antes y después de la perfusión ductal con determinadas sustancias como bilis infectada o estéril, etanol, ácido acetil salicílico o ácido clorhídrico. Este modelo es muy válido para el estudio de agentes implicados en la patogénesis de la pancreatitis aguda.

### **1.4.2 Modelos celulares de pancreatitis aguda**

#### **1.4.2.1 Modelo de pancreatitis inducida por dieta**

En 1975 Lombardi observó que ratones hembra jóvenes alimentados con una dieta deficiente en colina y suplementada con DL- metionina al 0'5% desarrollaban una pancreatitis aguda letal en los 5 primeros días<sup>47</sup>. La pancreatitis se caracterizaba por una necrosis masiva del parénquima exocrino con intensa hemorragia y reacción inflamatoria estromal.

La secuencia de alteraciones histológicas y ultraestructurales demuestra que en este modelo se bloquea la exocitosis normal, llevando a una acumulación de gránulos de zimógeno dentro de las células

acinares. Posteriormente los lisosomas se fusionan con estos gránulos de zimógeno, fenómeno conocido como crinofagia. Esto resulta en la formación de grandes vacuolas que contienen tanto zimógenos pancreáticos digestivos como hidrolasas lisosomales, que son capaces de activar el tripsinógeno. La pancreatitis parece deberse a la activación intraparenquimatosa de los zimógenos, resultado de la actividad sinérgica de la deficiencia de colina con la toxicidad básica de la etionina sobre la célula acinar pancreática.

La severidad y mortalidad de este modelo puede reducirse mediante la limitación de la dieta, tanto en cantidad como en tiempo. Las ventajas de este modelo son la facilidad de inducción y el no requerir intervención quirúrgica. Como desventajas requiere la presencia de estrógenos y la potencial hepatotoxicidad de la dieta. Pese a las diferencias en patogénesis, este modelo experimental es muy parecido a la pancreatitis grave de los humanos, tanto en apariencia histológica como en parámetros clínicos (ascitis, acidosis, hipoxia, hipovolemia) como bioquímicos, siendo grande su utilidad y aplicabilidad<sup>275</sup>.

#### **1.4.2.2 Modelo de hiperestimulación con ceruleina**

La administración en la rata de dosis supramáximas de ceruleina, análogo de la colecistoquinina-pancreozimina, induce una pancreatitis aguda intersticial. Los gránulos de zimógeno y el contenido vacuolar son liberados, no en la superficie apical de la célula, sino en el borde basolateral y en el espacio intersticial. De esta forma se produce el edema intersticial característico de este modelo. Histológicamente aparecen, además del edema intersticial, un infiltrado inflamatorio y necrosis acinar.

Estos cambios ocurren al cabo de una hora del inicio de la infusión con ceruleina, llegando a su pico máximo a las 12 horas y posteriormente disminuyendo a las 24 horas. La hiperestimulación produce una pancreatitis leve y reversible. Otras ventajas de este modelo son que se realiza con técnicas no invasivas, las lesiones inflamatorias son distribuidas de manera homogénea y evita la rápida y severa necrosis, lo que la convierte en especialmente apropiada para el estudio de la célula acinar. En humanos hay dos formas de pancreatitis por estimulación supramáxima de la célula acinar, la ingestión de anticolinesterasa y el veneno de escorpión.

En 1992, Schmidt desarrolló un modelo experimental que combinaba la ceruleina endovenosa con dosis bajas de ácido glicodeoxicolico intraductal<sup>276</sup>. Este modelo permite que la severidad sea progresiva en el tiempo, fácilmente modulada y su morfología parecida a la pancreatitis humana.

Una observación característica del modelo de pancreatitis por ceruleina es que no produce cambios en el nivel de xantina oxidasa<sup>130</sup>. Ello indica que enzimas proteolíticas, como la tripsina, pueden activar zimógenos y la fosfolipasa A<sub>2</sub>, pero que no se afecta la compartimentación subcelular, no pudiendo estas mismas enzimas actuar sobre el citoplasma y la XOD. La fuente de RLO en este modelo no es la célula acinar destruida sino las células inflamatorias. La muerte celular no es generalizada y tras la administración de ceruleina, la inflamación desaparece. Este modelo de pancreatitis en ratas se asocia con una lesión pulmonar reversible caracterizada por lesión sobre las células del

endotelio pulmonar y alveolo capilar secundaria a RLO producidos por neutrófilos<sup>75</sup>.

### **1.4.3 Otros modelos de pancreatitis aguda experimental**

#### **1.4.3.1 Modelo de isquemia-reperfusión pancreática**

La infusión intrararterial de microesferas de 8-20  $\mu\text{m}$  puede provocar en perros una pancreatitis grave por obstrucción irreversible de arteriolas terminales. La utilización de partículas más grandes provoca únicamente edema glandular, probablemente porque la oclusión de vasos más proximales permite la circulación colateral<sup>277</sup>.

No hay evidencias de que la oclusión temporal (inferior a una hora), parcial o completa de la circulación pancreática, por si sola sea capaz de inducir una pancreatitis grave. En estos experimentos solo se han producido moderados cambios histológicos y funcionales completamente reversibles. Por otra parte, si está demostrado que la isquemia, superpuesta al edema pancreático conduce a una pancreatitis grave. Así, la oclusión arterial durante 15 minutos, tras la inducción de una pancreatitis leve mediante ligadura ductal o hiperestimulación resulta en necrosis del parénquima pancreático. Ello puede deberse a la alteración del metabolismo energético pancreático<sup>278</sup>.

En la actualidad existen modelos de isquemia completa, normotérmica, *in situ* sobre un fragmento de cola pancreática de ratas, mediante la obstrucción selectiva de los vasos esplénicos tras infusión de suero salino. A las 2 horas de la perfusión existe un aumento de la

lipasa sérica y lesión histológica. Este modelo concreto permite la infusión selectiva a este segmento pancreático de diversas sustancias<sup>279</sup>.

Más adelante en esta obra se dedica un capítulo al modelo de trasplante pancreático experimental, haciendo énfasis en la fisiopatología de la isquemia-reperfusión pancreática.

#### **1.4.3.2 Páncreas ex vivo perfundido y aislado**

En este modelo, descrito por primera vez en 1977 por Saharia, el páncreas es aislado por un corto muñón de duodeno. Se colocan catéteres de perfusión en la arteria esplénica, en la arteria mesentérica superior y en la vena porta. También se canula el conducto pancreático. Las pancreatitis biliar, enólica e isquémica se pueden reproducir mediante obstrucción parcial del conducto con estimulación de secretina, infusión de ácidos grasos libres y con isquemia caliente durante 2 horas. Se presentan alteraciones funcionales a partir de las 2 horas. Dada su complejidad, elevado coste económico y de preparación, es un modelo no ampliamente aceptado.

#### **1.4.3.3 Modelo de pancreatitis inmune**

En 1955, Thal indujo una pancreatitis a conejos sensibilizados a la ovoalbúmina mediante la inyección de esta sustancia provocando la reacción de Arthus. Posteriormente se han administrado endotoxinas bacterianas de manera sistémica e intraductal resultando pancreatitis con necrosis y hemorragia (reacción intrapancreática de Schwartzmann).

## **1.5 Síndrome de isquemia-reperfusión**

La lesión por isquemia-reperfusión (I/R) es un proceso complejo que se inicia cuando el órgano se ve privado temporalmente de flujo sanguíneo (**isquemia**) y se manifiesta de forma predominante tras el posterior restablecimiento del flujo (**reperfusión**). Esta lesión tiene dos componentes fundamentales, la lesión de isquemia *per se* debida a la hipoxia, y la lesión de reperfusión provocada por la síntesis de diversos mediadores inflamatorios.

En condiciones de oxigenación normal, la síntesis de diferentes sustancias se realiza mediante ciclos metabólicos aeróbios, cuyo resultado es la obtención de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) y metabolitos fácilmente eliminables como el CO<sub>2</sub> y el agua. En la fase de isquemia, la falta de oxígeno conduce al metabolismo anaeróbico, con un rendimiento energético inferior y un incremento de otros metabolitos, como la hipoxantina o el ácido láctico. La acidosis resultante altera la cinética normal de las enzimas y la célula se ve privada de la energía necesaria para mantener la homeostasis. La depleción de ATP produce una alteración de las bombas sodio/potasio y calcio, perdiéndose el gradiente a través de las membranas celulares. Estos fenómenos provocan una alteración de las organelas citoplasmáticas y de la integridad de la membrana, que puede desencadenar la activación de proteasas y la muerte celular<sup>280</sup>.

En la fase de reperfusión, al restablecerse el flujo sanguíneo, ocurren dos procesos beneficiosos: se restituye el aporte de energía y se eliminan los metabolitos tóxicos. Sin embargo, en esta fase se producen

diferentes mediadores que inducen una respuesta inflamatoria inmediata, con la consiguiente alteración de la microcirculación y lesión tisular. Entre los mediadores proinflamatorios involucrados destacan los RLO, el TNF $\alpha$ , los eicosanoides y las endotelinas. Sus manifestaciones más evidentes son la acumulación y adherencia de neutrófilos, la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y el aumento de la permeabilidad vascular<sup>280</sup>. En varios modelos experimentales de isquemia, como la muscular esquelética, miocárdica o hepática la generación de TNF podría depender de los leucotrienos y fragmentos del complemento generados localmente en el órgano isquémico<sup>281</sup>. Para otros autores, la generación de TNF se produciría durante la fase de isquemia, siendo responsable de la lesión local<sup>282</sup>. El bloqueo de la síntesis de TNF en este modelo de isquemia de músculo esquelético solo sería eficaz si se administra previo a la fase de isquemia y atenuaría la lesión por I/R localmente, no impidiendo la infiltración pulmonar por leucocitos ni la lesión hepática. El mismo efecto se observa al bloquear el TNF con auto-anticuerpos tras la I/R intestinal<sup>283</sup>. Ello pone de manifiesto que la lesión sistémica de la I/R es debida a múltiples factores.

Son numerosos los estudios que han evaluado el papel del TNF en la lesión por I/R. El bloqueo del TNF previene el shock, la disminución del índice cardiaco y la hiporeactividad vascular<sup>284</sup>. El TNF potencia la expresión de ICAM-1<sup>285</sup>, E-selectina<sup>286</sup> y VCAM-1 en la célula endotelial y regula la expresión del complejo CD18. Mediante estos mecanismos participa del reclutamiento de neutrófilos en el pulmón y otros órganos.

A raíz de los cambios acaecidos en la fase de isquemia, cuando se produce un aumento de sustrato (hipoxantina) y la conversión de la enzima XOD, en presencia del oxígeno aportado por la reperfusión se generan los RLO. Estos fenómenos se han representado en la figura 14. La importancia del oxígeno en la lesión por I/R fue determinada hace tiempo en estudios que probaban que la repercusión hipóxica del tejido isquémico causaba muy poca lesión<sup>287</sup>. Pero otra fuente potencial de RLO es la NADPH oxidasa asociada a la membrana plasmática de los leucocitos polimorfonucleares circulantes. Estudios recientes han demostrado que la célula endotelial es muy vulnerable a la I/R. De este modo, la lesión primaria de la I/R se manifiesta en la célula endotelial, se amplifica por la presencia de neutrófilos implicados a raíz de la quimiotaxis procurada por los RLO (generados por la xantina oxidasa) o por la propia lesión endotelial. La activación de los neutrófilos incrementa la lesión celular y la liberación de RLO (figura 21). Este esquema reproduce cambios moleculares y bioquímicos que son característicos de una respuesta inflamatoria. La intensidad de esta respuesta en el tejido postisquémico puede ser de tal magnitud que la lesión por reperfusión se manifieste en órganos a distancia como el pulmón y termine con el desarrollo de un SIRS<sup>288</sup>. Ejemplo de ello son los estudios de Colletti sobre I/R hepática que inducen la liberación sistémica de TNF $\alpha$  provocando lesión pulmonar y secuestro de neutrófilos<sup>289</sup>.

En la isquemia-reperfusión, la lesión de la microcirculación es de una importancia crítica. En las arteriolas se produce un deterioro de la relajación del músculo liso mediada por el óxido nítrico. En los capilares

un incremento de la permeabilidad y una disminución del número de capilares perfundidos. En las vénulas postcapilares se producen los cambios más importantes, presentando un aumento en la adhesión y migración leucocitaria, agregación leucocito-plaquetar, extravasación de albúmina y generación de RLO.

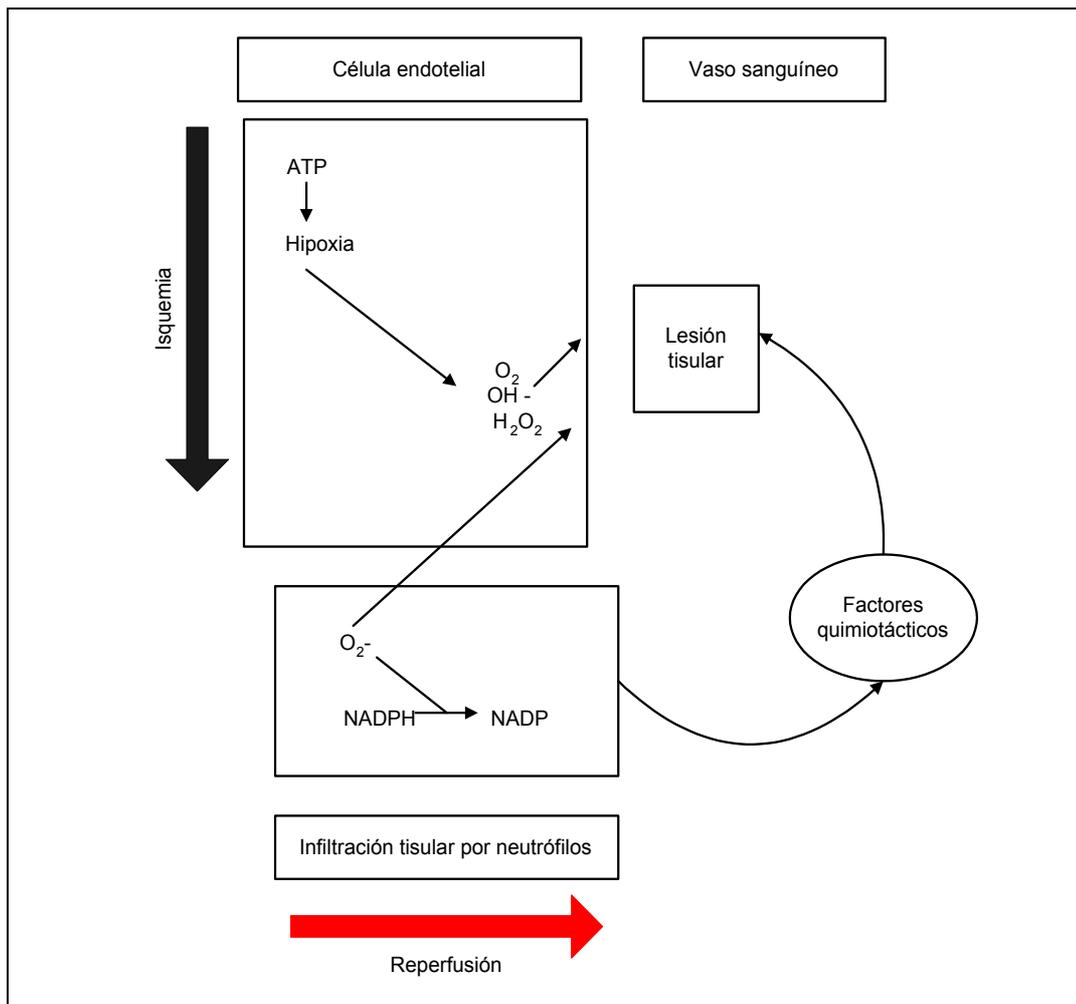


Figura 21. Síndrome de isquemia-reperfusión.

Recientemente se ha establecido una relación entre el NO y la producción de RLO en la célula endotelial. En condiciones normales, las células endoteliales presentan un equilibrio en el que el flujo de NO excede la producción de RLO. Ello permite al NO tamponar los escasos niveles de superóxido, reducir el tono arteriolar, prevenir la agregación

plaquetar y minimizar las interacciones adhesivas entre leucocitos y superficie endotelial. Tras la reperfusión de un tejido isquémico, los niveles de RLO exceden las capacidades de NO<sup>288</sup>. Se ha postulado que los RLO reaccionan con la célula endotelial para inducir la síntesis de mediadores (PAF, LTB<sub>4</sub>), promover la expresión y activación de glicoproteínas de adhesión (ICAM, ELAM), e inactivar el NO derivado del endotelio (que actúa como molécula antiadhesión endógena)<sup>280</sup>. El papel de la célula endotelial en la lesión por I/R se resume en la figura 22.

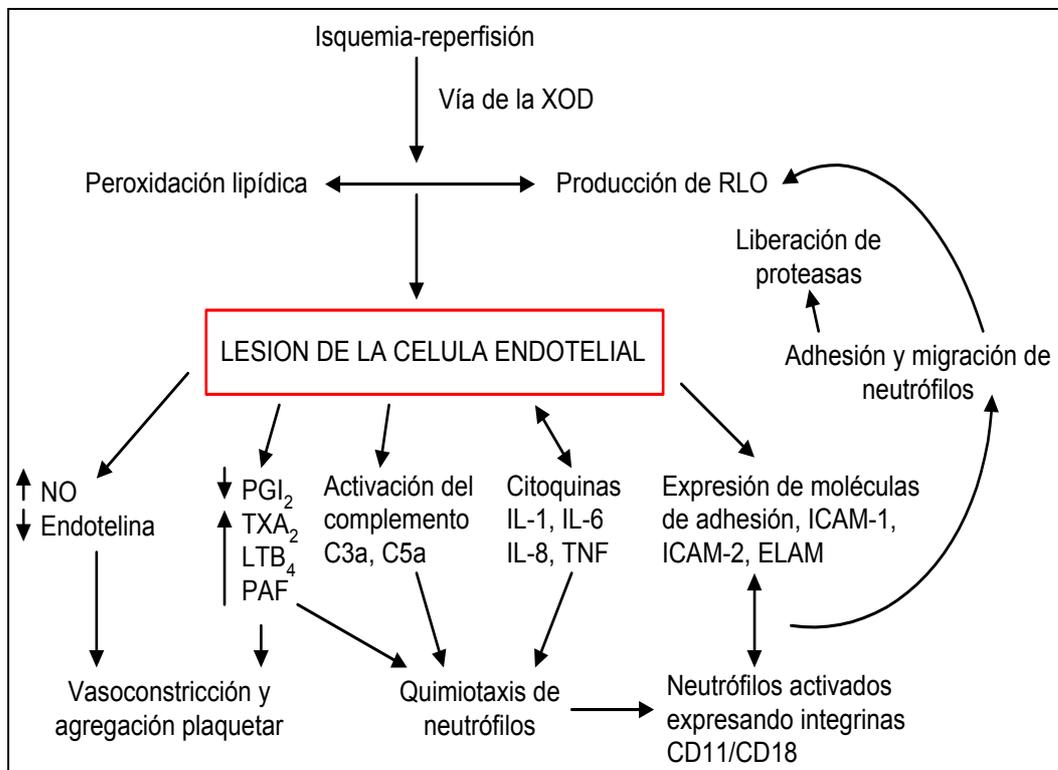


Figura 22. Papel de la célula endotelial en la lesión por isquemia-reperfusión.

La función del NO en la isquemia-reperfusión aún no está del todo aclarada. Existen diversos estudios contradictorios, y las diferencias entre ellos solo pueden explicarse parcialmente por la utilización de diferentes modelos de I/R en distintos órganos. Así por ejemplo, Benz demuestra el efecto protector del nitroprusiato sódico (donante de NO) en las fases iniciales de la reperfusión al provocar una mejora en la microcirculación

en relación a su efecto vasodilatador<sup>290,291</sup>. Nuestro grupo demostró, sin embargo, que la inhibición de la sintasa del NO atenúa la lesión postisquémica en el páncreas<sup>292</sup>.

Recientemente se ha demostrado que la expresión de la iNOS durante la reperfusión contribuye significativamente al desarrollo de la lesión pancreática<sup>293</sup>.

Las alteraciones microcirculatorias de la I/R provocan el deterioro de la perfusión nutritiva capilar y el acúmulo y adherencia de neutrófilos en las vénulas postcapilares. Estos dos fenómenos han sido ampliamente estudiados y se conocen como el fenómeno de “no-reflujo” y la “paradoja de reflujo”<sup>294</sup>. El fenómeno de “no reflujo” causa isquemia tisular persistente y no parece una alteración primaria de la reperfusión capilar sino la consecuencia de un corto periodo de reperfusión seguido de isquemia. Se debe a la progresiva obstrucción de la microcirculación y se correlaciona con el tiempo de isquemia. Puede reducirse por la administración de agentes fibrinolíticos al inicio de la reperfusión, lo que sugiere que la aposición de fibrina impide la apertura de los vasos, sin embargo existen otras teorías que intentan explicar, como la hemoconcentración local o el edema de las células endoteliales<sup>295</sup>. La “paradoja de reflujo” se define como un deterioro secundario de la perfusión nutricional provocado por la adherencia masiva de neutrófilos a la pared capilar y correspondería a una isquemia terciaria, con un aumento de la permeabilidad vascular a macromoléculas. Este proceso se inicia en la reperfusión pero es también dependiente del tiempo de isquemia. Ambos fenómenos se han demostrado por microscopia

intravital pero su efecto en la oxigenación tisular estimado por oximetría tisular continua no se ha identificado<sup>296</sup>.

El páncreas es un órgano muy sensible a la isquemia y la hipoxia. La isquemia-reperfusión del páncreas perfundido *ex vivo* induce edema en la glándula pancreática. Estudios experimentales han demostrado que no hay cambios aparentes en el páncreas tras 1 hora de isquemia sin perfusión<sup>297</sup>. Los cambios microscópicos en la glándula tras dos horas de I/R incluyen edema intersticial, hemorragia focal e infiltración granulocitaria. A microscopía electrónica, las lesiones pancreáticas tras el mismo tiempo de isquemia-reperfusión revelan lesión de la célula acinar con degeneración vacuolar, extensión irregular del retículo endoplasmático, mitocondrias hinchadas y pérdida de la estructura de la cromatina<sup>298</sup>. Los cambios aumentan de forma gradual al transcurrir el tiempo de perfusión. Así, a las 48 horas aparece condensación de la célula acinar, con núcleo pequeño, separándose de las células periféricas intactas por un halo indicando procesos de apoptosis, con poca evidencia de necrosis. La apoptosis es una característica particular de los modelos experimentales de I/R, aunque se ha apreciado en otros modelos de pancreatitis experimental, como la ligadura ductal o la inducida por dieta.

En la I/R pancreática, la apoptosis puede ser detonada por los RLO o por citoquinas en la lesión por perfusión y parece ser un proceso paralelo aunque independiente de la infiltración por neutrófilos. En el primer supuesto ello ocurre en las fases iniciales de la perfusión e involucra a las mitocondrias. En el caso de la activación por citoquinas, esta puede ocurrir varias horas tras la perfusión. El papel exacto de la

apoptosis en la I/R es aún desconocido. Algunos autores han demostrado que la lesión por I/R a nivel renal o cardíaco se reduce cuando se administran agentes antiapoptóticos antes de la reperfusión en modelos de isquemia caliente en ratones<sup>299</sup>. Otros han argumentado que al bloquear la apoptosis tras un periodo de isquemia cerebral, las células lesionadas no se recuperan y continúan liberando sustancias proinflamatorias que las llevarán a la necrosis<sup>300</sup>.

La lesión pulmonar por la I/R tisular se caracteriza por un edema no cardiogénico, aumento de la permeabilidad capilar y acúmulo de neutrófilos, que han migrado al pulmón tras ser activados por mediadores liberados por el tejido reperfundido, provocando engrosamiento intersticial pulmonar<sup>301</sup>.

En resumen, la lesión por isquemia-reperfusión se atribuye a la generación de RLO durante la reperfusión con la subsiguiente peroxidación lipídica de las membranas celulares. Ello resulta en la generación de potentes mediadores quimiotácticos, liberación de citoquinas, activación del complemento y proteasas, expresión endotelial de diversas moléculas de adhesión y activación y atracción de neutrófilos. La lesión endotelial es un factor contribuyente en la manifestación de la lesión orgánica postisquémica debida a un desequilibrio entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras.

### **1.5.1 Papel de la isquemia en la pancreatitis aguda**

La relación entre la isquemia pancreática y la pancreatitis fue descrita por primera vez en 1886, cuando Panum inyectó gotas de cera en las arterias del páncreas generando una pancreatitis aguda

hemorrágica. Tras la inyección intraarterial de microesferas, la severidad de la pancreatitis resultante depende del tamaño de las partículas<sup>298</sup>.

El mecanismo lesivo de la isquemia-reperfusión parece participar en la fisiopatología de la pancreatitis aguda. La lesión isquémica sobre el páncreas ocurre en numerosos supuestos clínicos, como la cirugía cardíaca, el shock hipovolémico o el trasplante pancreático. Numerosos estudios experimentales prueban que los procesos isquémicos de la glándula pancreática inducen pancreatitis aguda, con elevación de enzimas pancreáticas, edema intersticial e infiltración por células inflamatorias<sup>302</sup>. Algunos investigadores han demostrado también que un cierto grado de hipoperfusión del tejido pancreático ocurre durante la pancreatitis<sup>303</sup>.

Para examinar los efectos tóxicos sobre el páncreas de los RLO generados tras I/R, un estudio experimental propuso ligar la arteria mesentérica y el tronco celíaco en animales de experimentación por diferentes tiempos, para posteriormente liberarlas y recuperar el flujo. En el grupo que prolongó la isquemia 60 minutos los niveles de amilasa y lipasa se multiplicaron por 6 al medirlos 7 horas tras la perfusión. En el grupo con 30 minutos de isquemia los niveles no cambiaban respecto a los controles. Histológicamente, se observó vacuolización de las células acinares pancreáticas solo en un grupo de ratas con 7 horas de isquemia. En animales con 60 minutos de isquemia y perfusión continua de SOD (3600 U/Kg/hora), la secreción de amilasa y lipasa disminuyó al 25 % de los grupos sin SOD. Estos resultados confirman que los RLO generados

tras la isquemia-reperfusión lesionan el páncreas y que el uso de la SOD reduce los niveles de amilasa y lipasa<sup>304</sup>.

Existen múltiples evidencias de un paralelismo entre las lesiones de pancreatitis aguda e isquemia-reperfusión. Así, otro modelo murino ha demostrado que los niveles de NO y la expresión de la NOS tras la I/R pancreática están elevados en páncreas y pulmón, induciendo lesión pancreática<sup>305</sup>.

La acidosis es una característica de la isquemia tisular. En un intento por mantener las reservas energéticas mediante la síntesis de ATP a partir de glicógeno, el pH intracelular desciende secundariamente a la acumulación de ácido láctico y fosfatos inorgánicos por glicólisis anaerobia. Esta acidosis celular aumenta el potencial de la catepsina B, que actúa a un pH óptimo de 3'8, para activar el tripsinógeno intracelular. Esto podría explicar la presencia de tripsina extraluminal activada como un evento temprano en la patogénesis de la pancreatitis aguda. Además, la acidosis lleva a la activación de endonucleasas, que pueden inducir la fragmentación de la cromatina en el núcleo y lesión celular por apoptosis. Durante la reperfusión se produce un flujo masivo de calcio al interior de la célula, favorecido por los defectos de la membrana debidos a la pérdida de fosfolípidos secundaria a la peroxidación lipídica provocada por los RLO. El calcio provocará lesión celular por activación de las fosfolipasas y a su vez provocará lesiones de la membrana celular<sup>295</sup>.

En la pancreatitis aguda, tanto clínica como experimental, se producen cambios en la microcirculación que contribuyen a la isquemia glandular. A su vez, la característica de circulación arterial terminal que

presentan las arteriolas intralobulares sugiere que la microcirculación pancreática es altamente susceptible a la lesión isquémica. Varios mediadores vasoactivos como la bradicinina, el FAP, endotelina y NO participan en el desarrollo del fracaso microcirculatorio<sup>306</sup>. Kusterer describió algunos aspectos importantes sobre los cambios microcirculatorios en la pancreatitis inducida por ácido taurocólico, como el aumento de la permeabilidad vascular, la vasoconstricción arterial intralobular, isquemia, estasis de la perfusión capilar, reperfusión y adherencia de los leucocitos al endotelio de las vénulas interlobulares<sup>307</sup>. Así mismo se produce coagulación intravascular y trombosis. La infiltración inflamatoria participa de la lesión isquémica. Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular formando placas que reducen el flujo sanguíneo ocluyendo microvasos. Todo ello sugiere que la isquemia actúa posiblemente como un factor iniciador de la lesión microcirculatoria en la pancreatitis aguda, o al menos como un mecanismo agravante o perpetuante. Actualmente existe la tendencia a considerar la I/R como un cofactor que convierte un estímulo inicial sobre el páncreas en una pancreatitis severa, más que en una causa por si sola. Parece que la isquemia hace a la célula acinar más susceptible a lesiones por estímulos que induzcan la activación de la autodigestión por proteasas.

Sin embargo, el papel exacto de la isquemia en la patogénesis de la pancreatitis aguda es aún desconocido. Algunos estudios demuestran que la isquemia tiene poco efecto sobre el páncreas, mientras otros han demostrado asociación con la lesión pancreática. En el páncreas, la lesión se aprecia habitualmente tras isquemia completa, lo que en clínica es

poco frecuente. La isquemia pancreática provoca lesiones en la célula acinar, causando la activación de lisosomas y enzimas digestivas que llevan a la autodigestión glandular<sup>306</sup>. La pancreatitis crónica experimental se caracteriza por disminución del flujo sanguíneo pancreático, descenso del pH intersticial y disminución de la oxigenación del tejido pancreático, todos ellos hallazgos consistentes con mecanismos de isquemia-reperusión. La pancreatitis aguda se asocia también a una reducción del flujo sanguíneo pancreático, con evidencia de generación de radicales libres, que también sugieren la posible participación de un síndrome de isquemia-reperusión<sup>308</sup>.

En diferentes modelos experimentales de I/R, los resultados del análisis de la glándula pancreática tienen una importante variabilidad. Así, la isquemia pancreática, seguida de 1 hora de reperusión muestra una pancreatitis con un edema inter e intralobular moderado, algún foco de hemorragia, pero escaso infiltrado inflamatorio por leucocitos y ausencia de necrosis, o al menos inferior al 15% de las células acinares<sup>309</sup>. Sin embargo, una isquemia de dos horas seguida de reperusión pancreática por 5 días lleva al desarrollo de una pancreatitis aguda con necrosis y hemorragia verificadas histológicamente y con una mortalidad del 50%. Los cambios morfológicos son compatibles con la pancreatitis clínica grave, con la pancreatitis grave experimental y con la pancreatitis tras el trasplante<sup>276,310</sup>. Parece ser que la máxima intensidad de los signos de lesión pancreática se observan entre el primer y segundo día de la reperusión, y que a partir del décimo día aparecen signos de regeneración pancreática con una apariencia similar a la pancreatitis

crónica<sup>311</sup>. Estos y otros estudios similares, realizados con microscopía por fluorescencia intravital indican que la I/R completa induce lesión microvascular, y que la gravedad de esta lesión dependerá de la duración de ambas fases<sup>312</sup>.

Recientemente un estudio ha evaluado el efecto de la administración de factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el curso de una pancreatitis aguda inducida por I/R. El EGF ejerce una influencia beneficiosa y ello parece deberse a la reducción en la activación de la cascada pro-inflamatoria de las interleuquinas, la mejora del flujo sanguíneo pancreático y el aumento del crecimiento de las células acinares<sup>313</sup>.

La figura 23 resume los mecanismos fisiopatológicos de la pancreatitis inducida por isquemia-reperfusión.

### **1.5.2 Trasplante de páncreas experimental**

La técnica del trasplante de páncreas experimental ofrece la posibilidad de estudiar problemas técnicos del trasplante, pero también cuestiones inmunológicas o nuevas terapias inmunosupresoras. Desde la descripción del injerto duodeno-pancreático con anastomosis porto-sistémica y duodeno-yeyunal por Lee en 1971<sup>314</sup> han aparecido otros modelos de trasplante pancreático experimental, si bien los mejores resultados en cuanto a supervivencia de animales e injertos, así como funcionalismo endocrino y exocrino se obtienen con este modelo<sup>315</sup>. El principal inconveniente de esta técnica es la mortalidad, principalmente debida a trombosis vascular, pancreatitis del injerto y hemorragia<sup>316</sup>.

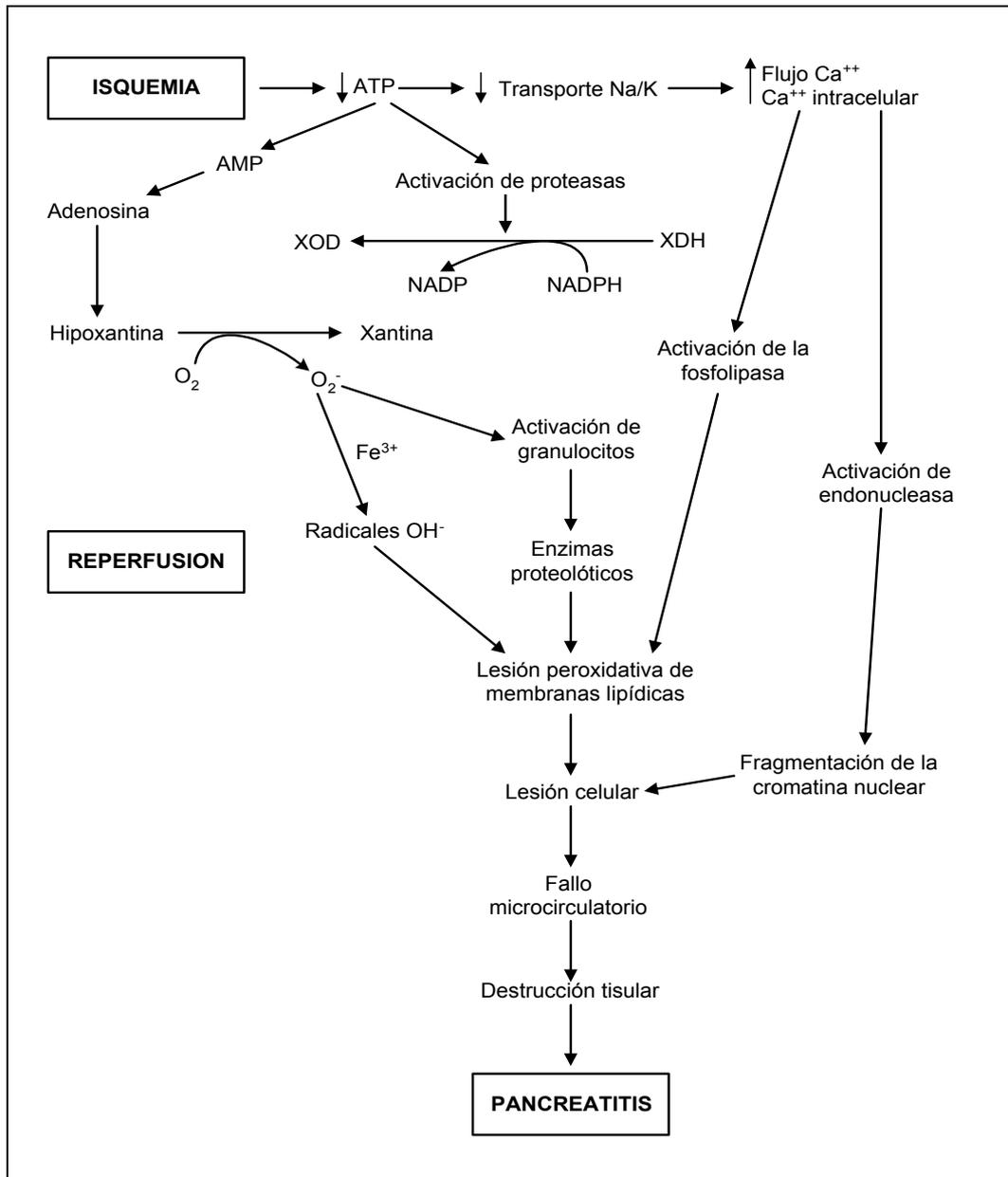


Figura 23. Fisiopatología de la pancreatitis mediada por isquemia-reperfusión.

A pesar del enorme progreso en técnica quirúrgica e inmunosupresión, la pancreatitis del injerto es un problema clínico de primera magnitud y puede suponer la pérdida del injerto<sup>317</sup>. La fisiopatología de la pancreatitis del injerto aún no es del todo conocida aunque parece claro que la I/R es un factor patogenético de primer orden. El páncreas es un órgano con un intrínsecamente reducido bajo flujo sanguíneo comparado con otros órganos, y para algunos autores el

deterioro de la microcirculación en las fases iniciales de la reperfusión es crucial en el desarrollo de la lesión por I/R<sup>318</sup>. La disfunción microvascular postisquémica incluye deterioro de la perfusión capilar y activación leucocitaria<sup>319</sup>. Estas alteraciones microvasculares podrían ser debidas en parte a un aumento en la producción local de eicosanoides. Hace años que se demostraron las alteraciones del metabolismo del ácido araquidónico después del trasplante pancreático experimental<sup>179</sup>, con elevación del LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, y confirmando la relación entre los RLO, la fosfolipasa A<sub>2</sub> y los eicosanoides. Otros estudios relacionan la elevación de PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> con el rechazo celular de aloinjertos<sup>320</sup>. Pí y colaboradores demostraron que la xantina oxidasa no era la única fuente de RLO en un modelo de trasplante pancreático al inhibir su acción a nivel del endotelio mediante el alopurinol contenido en la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin<sup>321</sup>. La infiltración polimorfonuclear masiva tras la reperfusión parece tener un importante papel en el desarrollo de la lesión y podría ser el nexo de unión entre la I/R y la respuesta inflamatoria. De hecho es conocido que el sistema de la oxidasa dependiente de NADPH en la membrana de los neutrófilos es una fuente muy importante de aniones superóxido. Además se ha comprobado que la inhibición de la elastasa de los neutrófilos disminuye la acumulación de estas células tras la reperfusión del injerto duodeno-pancreático en el trasplante experimental, reduciendo la lesión por I/R<sup>322</sup>. La N-acetilcisteína interfiere la producción de RLO al inhibir las granulocitos activados, además de inducir la síntesis de glutatión y por ambas cosas su aplicación experimental disminuye la lesión por I/R<sup>323</sup>.

La lesión estructural y funcional de la glándula pancreática debida a la I/R tras el trasplante se caracteriza por la ya citada acumulación y adherencia leucocitaria, agregación plaquetaria, vasoconstricción y alteraciones de la permeabilidad capilar que puede cuantificarse con microscopía de fluorescencia intravital<sup>294</sup>.

La patogénesis de las alteraciones microcirculatorias de la I/R pancreática es multifactorial. Un mecanismo esencial es el desequilibrio entre dos de los mediadores vasoactivos más potentes, la endotelina 1(ET-1) y el NO. La endotelina juega un importante papel regulador en la microcirculación pancreática, no solo mediando la lesión local sino también las alteraciones sistémicas. Además de propiedades vasoactivas, esta molécula posee influencias en la secreción de citoquinas por los monocitos, habiéndose demostrado que induce una expresión elevada de mRNA de IL-6 en animales sometidos a trasplante pancreático experimental vía la activación del NF-κB. El bloqueo del receptor de la ET-1 reduce la lesión por I/R en el trasplante pancreático experimental en cerdos<sup>324</sup>. Por otro lado, la formación de óxido nítrico (NO) en la isquemia-reperfusión asociada con el trasplante de páncreas puede modular la respuesta inflamatoria. Durante la isquemia se produce un aumento del calcio intracelular y la NOS es una enzima dependiente del calcio que genera óxido nítrico de la conversión de L-arginina a citrulina. El efecto nocivo del NO puede relacionarse a su reacción con RLO, inducción de la síntesis de eicosanoides y lesión por lipoperoxidación. Diversos estudios han demostrado la acción del NO sobre sustancias vasoactivas como la prostaciclina o la endotelina. La inhibición de la síntesis de NO en un

modelo experimental de trasplante pancreático evitó los incrementos en endotelina, prostaciclina e infiltración leucocitaria. La administración de endotelina tras inhibir la síntesis de NO revirtió el efecto, resultando un aumento de la mieloperoxidasa y 6-keto-PGF<sub>1α</sub><sup>325</sup>. Estos resultados sugieren que los efectos del NO en la lesión por I/R asociada al trasplante de páncreas son mediados por la inducción de la síntesis de endotelina. Además, la preservación mediante solución de Wisconsin no protege frente a las acciones derivadas del NO<sup>291</sup>. Por otra parte, la inhibición de la producción de NO solo se ha mostrado eficaz en prevenir el daño por I/R tras periodos de isquemia cortos (6 horas), sugiriendo que tras periodos de isquemia más prolongados (12 horas) otros mediadores proinflamatorios son inducidos y participan de la lesión<sup>326</sup>.

Sin embargo, el papel del NO es controvertido y para otros autores ejerce un efecto beneficioso en la lesión por I/R tras el trasplante de páncreas experimental. Así, el tratamiento con L-arginina, sustrato de la producción de NO, durante la reperfusión provoca un incremento de la perfusión pancreática. Concentraciones elevadas de NO se relacionan con un aumento de los diámetros de los capilares acinares, tienen propiedades anticoagulantes por inhibición de la agregación y adhesión plaquetar y mitigan el efecto de los RLO<sup>327</sup>. La L-Arginina puede inhibir la acumulación de neutrófilos en el páncreas y por ello tener efecto protector en la I/R tras el trasplante pancreático<sup>328</sup>.

El verdadero papel del NO en la isquemia-reperfusión no está aún esclarecido. Parece ser que los efectos citotóxicos son relevantes en

periodos de isquemia cortos, mientras que los efectos beneficiosos se aprecian en periodos de isquemia prolongados.

La expresión endotelial aumentada de ICAM-1 tras el trasplante se correlaciona positivamente con el deterioro microvascular. Importantes cambios inflamatorios tienen lugar en las primeras 6 horas postreperusión. La aplicación profiláctica de anticuerpos monoclonales contra ICAM-1 reduce la lesión por reperusión y previene la ocurrencia de pancreatitis del injerto<sup>329</sup>.

La fase inicial de la pancreatitis del injerto parece secundaria a una alteración de la vía secretora, como ocurre en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. La modificación de la integridad celular por el desequilibrio entre proteasas y antiproteasas causado por la hipoxia lleva a la activación del sistema lisosomal, con crinofagia y necrosis celular<sup>310</sup>. Mediante la comparación entre las características histológicas y bioquímicas de isoinjertos y aloinjertos, puede sugerirse que la lesión por isquemia-reperusión inicia la pancreatitis por la generación de RLO, y que la transformación a necrosis pancreática en aloinjertos refleja el papel de factores quimiotácticos inmunes y secreción extracelular de proteasas activadas<sup>330</sup>. En la actualidad existe la creencia de que la apoptosis contribuye de un modo importante a la muerte celular en la lesión por I/R<sup>331</sup>. La apoptosis de la célula acinar se ha demostrado en el rechazo de aloinjertos en trasplante clínico de páncreas<sup>332</sup> y en la lesión experimental por I/R caliente<sup>296</sup>.

Recientemente se ha otorgado un papel a las proteínas de shock térmico (HSP) en la reducción de la lesión por isquemia-reperusión. Estas

moléculas previenen la lesión y/o aceleran los procesos de reparación. Estudios inmunohistoquímicos demuestran expresión de HSP90 en injertos pancreáticos de trasplante experimental en perros empleando solución de preservación de Wisconsin, mientras que no hay alteraciones de HSP70 ni HSP32. Ello puede deberse a que la HSP90 se expresa de forma constitutiva, mientras que las otras dos moléculas son inducibles<sup>226</sup>.

Los estudios hasta ahora realizados con modelos trasplante pancreático se centran en los efectos locales de la I/R pancreática. No existen estudios que valoren la implicación del hígado en la respuesta sistémica a dicha lesión.

---

## 2 Hipótesis de trabajo

La pancreatitis aguda es una enfermedad inflamatoria que puede presentar asociada una compleja respuesta sistémica. La evolución de la enfermedad puede depender de la intensidad de dicha respuesta. Las teorías fisiopatológicas sobre los mecanismos que desencadenan la pancreatitis aguda y sus complicaciones sistémicas se basan en la acción de enzimas activados tanto a nivel local como sistémico.

Entre las complicaciones sistémicas inmediatas de la pancreatitis aguda grave, las alteraciones respiratorias se presentan hasta en un 60% de los casos, siendo la causa de muerte temprana (dentro de la primera semana) en el 70% de los casos. Estas manifestaciones clínicas y radiológicas respiratorias son indistinguibles del síndrome del “distrés” respiratorio del adulto (SDRA)<sup>333</sup>. La patogénesis del fallo pulmonar se fundamenta en dos puntos básicos que no tienen relación con los factores etiológicos de la pancreatitis aguda: el aumento de la permeabilidad vascular y la activación de los leucocitos polimorfonucleares. La lesión

tisular pulmonar sería el resultado del daño endotelial secundario a productos derivados de los neutrófilos<sup>75,334</sup>. El fracaso pulmonar parece ser un proceso en el que la liberación de mediadores lleva a un efecto de amplificación “en cascada”, aunque actualmente los mecanismos responsables de la lesión pulmonar no son completamente conocidos y entre los factores inductores de la lesión se han implicado a los enzimas pancreáticos, fosfolipasa A<sub>2</sub> activada y a mediadores de la inflamación como los radicales libres de oxígeno, los prostanoïdes, el factor de necrosis tumoral, las interleuquinas y el óxido nítrico. La respuesta inflamatoria sistémica secundaria a una pancreatitis aguda sería similar a la que ocurre en la sepsis.

Nuestro grupo ya ha demostrado recientemente que el hígado juega un papel importante en el desarrollo de la lesión pulmonar inducida por la pancreatitis aguda<sup>84,255</sup>. Según estos datos, en la pancreatitis experimental el hecho de que casi todos los enzimas y mediadores liberados por el páncreas al plasma circulen a través del hígado antes de su dilución en la circulación sistémica, sugiere que este paso podría ser determinante en el desarrollo de la lesión inflamatoria sistémica. Los enzimas proteolíticos y sustancias inflamatorias provenientes de la sangre portal tras una pancreatitis grave podrían, a su paso por el hígado, inducir la síntesis de TNF $\alpha$ , óxido nítrico y otros mediadores que desencadenarían una liberación “en cascada” de factores que desarrollarían lesiones en zonas alejadas del páncreas. El pulmón sería el órgano que primero manifiesta el proceso lesional. Trabajos realizados por nuestro grupo han demostrado que al realizar en el animal de

experimentación una derivación porto-sistémica previa a la inducción de la pancreatitis, (evitando así el paso hepático de mediadores proinflamatorios), se previene el desencadenamiento de la lesión pulmonar, por la falta de respuesta inflamatoria de los macrófagos alveolares y la ausencia de elevación de mediadores de inflamación aguda a nivel pulmonar<sup>84</sup>. El hígado se constituye en el órgano del que se originarían los factores que desarrollarían la lesión pulmonar.

Por otra parte, la isquemia-reperfusión de la glándula pancreática genera una respuesta inflamatoria local con características similares a la aparecida en la pancreatitis aguda. Estos datos se han obtenido a partir de los modelos experimentales de isquemia-reperfusión pancreática, utilizando en la mayor parte de casos el trasplante isogénico de páncreas. Sin embargo, los efectos sistémicos provocados por la lesión inflamatoria glandular tras la I/R así como la participación del hígado en su génesis son poco conocidos. En el modelo de trasplante heterotópico experimental de duodeno-páncreas descrito por Lee<sup>314</sup> el drenaje venoso portal se hace a la vena cava. En este caso los mediadores proinflamatorios implicados alcanzarían la circulación sistémica sin paso previo a través del hígado.

Nuestra investigación pretende realizar un estudio comparativo de la respuesta inflamatoria sistémica de dos situaciones que implican la lesión pancreática: la pancreatitis por administración intraductal de taurocolato sódico y la lesión de isquemia-reperfusión después de un trasplante isogénico heterotópico de páncreas. Con la utilización de este último modelo podremos conocer la posible amplificación de la respuesta

sistémica al inducir una pancreatitis del injerto con la administración intraductal de taurocolato sódico. En esta circunstancia también se podría conocer la influencia de factores pancreatotróficos en las alteraciones sistémicas de la pancreatitis aguda.

---

### **3 Objetivos**

1. Estudiar las respuestas local y sistémica, a nivel hepático y pulmonar, producidas tras la inducción de una pancreatitis aguda por administración intraductal de taurocolato sódico y la realización de un isotrasplante pancreático heterotópico experimental.
2. Realizar un estudio comparativo entre la respuesta sistémica a la inflamación pancreática en un modelo de pancreatitis aguda en páncreas nativo y la resultante tras la pancreatitis aguda de un injerto de trasplante pancreático.
3. Estudiar la modificación de la respuesta sistémica a la inflamación pancreática en presencia de tejido pancreático viable.



---

## **4 Material y métodos**

### ***4.1 Animales de experimentación***

Para la realización de este proyecto de investigación se han utilizado ratas macho de la cepa Lewis (Charles River Laboratories, Bélgica), albinas, con un peso corporal medio de 250 - 300 gr, histocompatibles para excluir el efecto del rechazo inmunológico, y mantenidas en el estabulario del Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona (Consejo superior de Investigaciones Científicas, CSIC), al menos durante una semana antes de su utilización, a una temperatura ambiental de  $21 \pm 2$  °C, con una humedad relativa del 70% y un ritmo luz / oscuridad de 12 horas. Su alimentación se realizó con pienso A04 Panlab (Reus, Tarragona, España). Todos los estudios se realizan de acuerdo con la Directiva 86/609/CEE de la Unión Europea para el uso de animales de experimentación.

## 4.2 Anestesia

Previamente a las intervenciones quirúrgicas, los animales fueron sometidos a anestesia general mediante la inyección intraperitoneal de uretano al 10% (10 mg en 100 ml de suero fisiológico) a dosis de 1 ml/100 gr de peso corporal. El procedimiento anestésico se muestra en la figura 24.



Figura 24. Procedimiento anestésico.

### 4.3 Modelos experimentales

#### 4.3.1 Modelo de pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico

La pancreatitis aguda se induce mediante la administración intraductal de taurocolato sódico al 5% según el método descrito por Aho<sup>269</sup>. Tras la inducción anestésica se realiza una laparotomía subcostal transversa (figura 25).



Figura 25. Laparotomía transversa subcostal.

Con una aguja se realiza un orificio en el borde antimesentérico del duodeno, a través del cual se introduce una cánula (Clay Adams PE10, de 0'6 mm de diámetro exterior) con la cual se buscará la papila de Vater para, atravesándola, situarse en la porción proximal del conducto biliopancreático<sup>335</sup> (figura 26).



Figura 26. Canulación del conducto biliopancreático a través del borde antimesentérico del duodeno.

Posteriormente se obstruye el conducto hepático con un clamp vascular durante la inducción de la pancreatitis (figura 27). Tras la canulación y clampaje se administra, mediante una bomba de infusión (Harvard Instruments, Edembridge, UK), una solución de taurocolato sódico (Taurocolato ácido, sal de sodio, T-0750, Sigma Chemical, San Louis, MO) al 5%, a dosis de 0'1 ml por cada 100 gr de peso corporal y con una velocidad de infusión de 0'3 ml por minuto. El resultado de dicha

infusión puede apreciarse de forma casi inmediata (figura 28). Por último se realiza el cierre de laparotomía con puntos sueltos de seda 2/0.

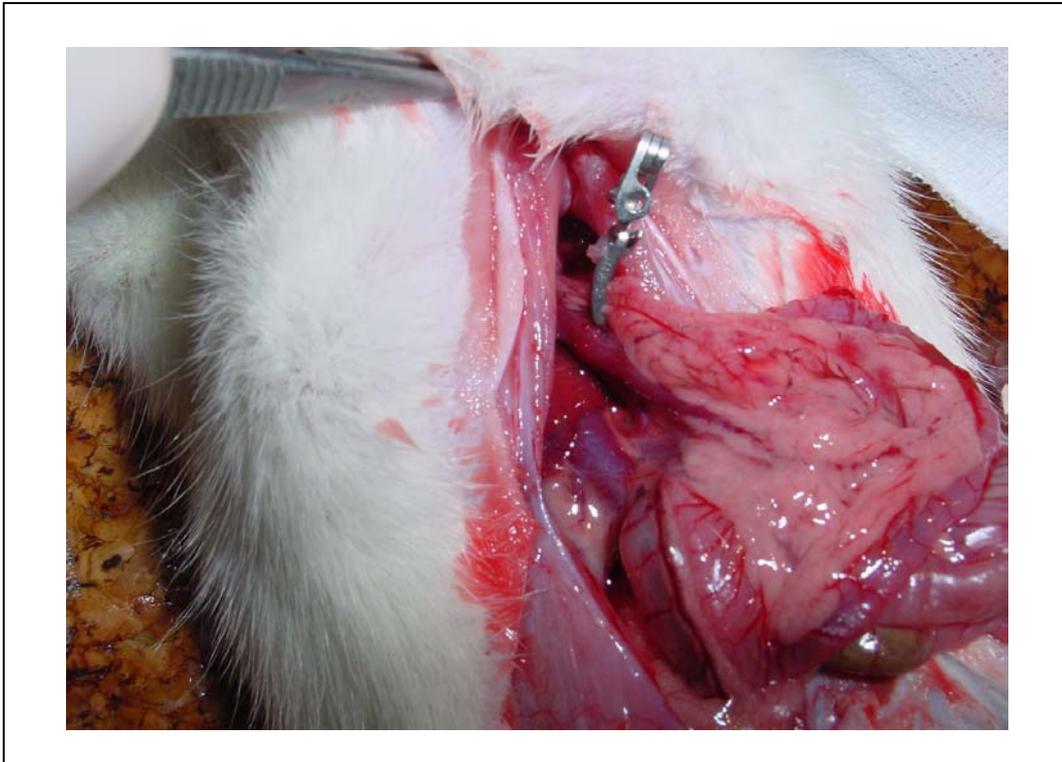


Figura 27. Oclusión del conducto hepático.



Figura 28. Aspecto del páncreas tras infusión de sal sódica de ácido taurocólico al 5%.

### 4.3.2 Modelo de trasplante pancreático isogénico heterotópico

Para la realización del trasplante pancreático isogénico heterotópico se realizó la técnica descrita por Lee<sup>314</sup> y modificada por nuestro grupo<sup>336</sup>.

La operación en la rata donante para la extracción del injerto se inicia mediante una incisión de laparotomía transversa subcostal. Se expone el marco cólico para ligadura y sección de la arteria cólica media. Se disecciona parcialmente el páncreas de los tejidos vecinos rechazando el epiplon mayor y estómago en dirección craneal. Se realiza la extirpación del bazo (figura 29).

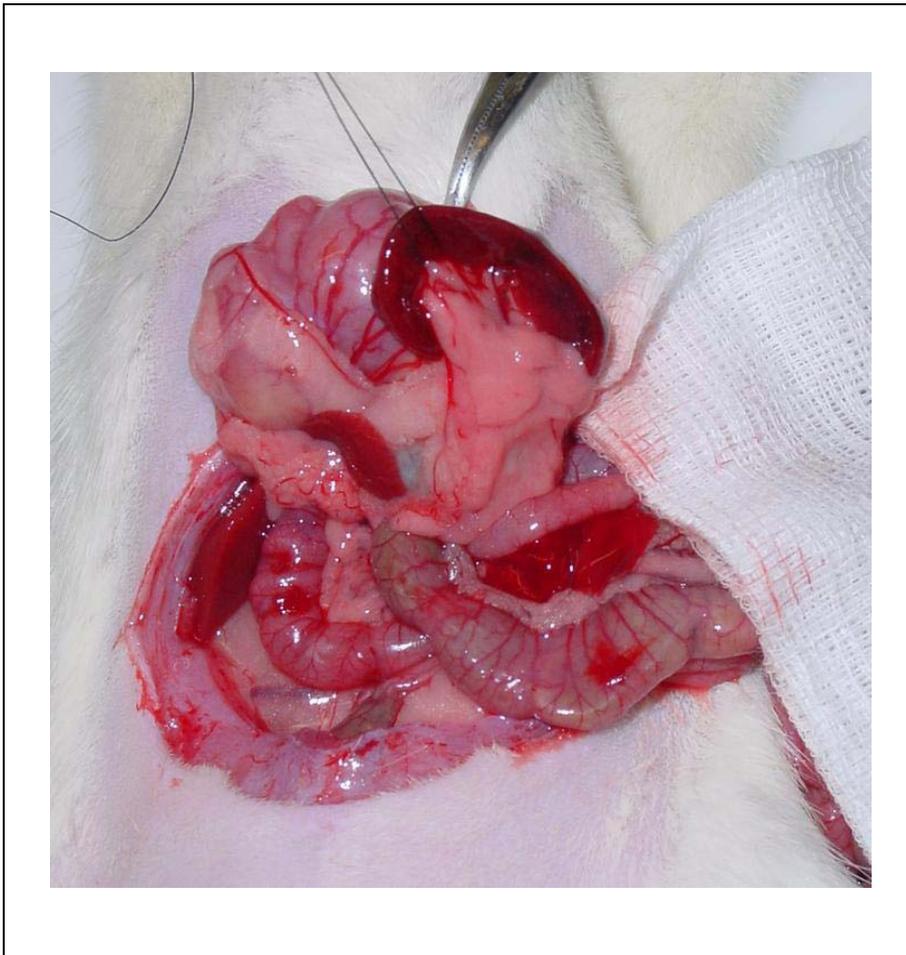


Figura 29. Disección y exéresis del bazo.

Se seccionan la arteria y vena coronaria estomáquicas entre ligaduras para la posterior transección del esófago (figura 30).

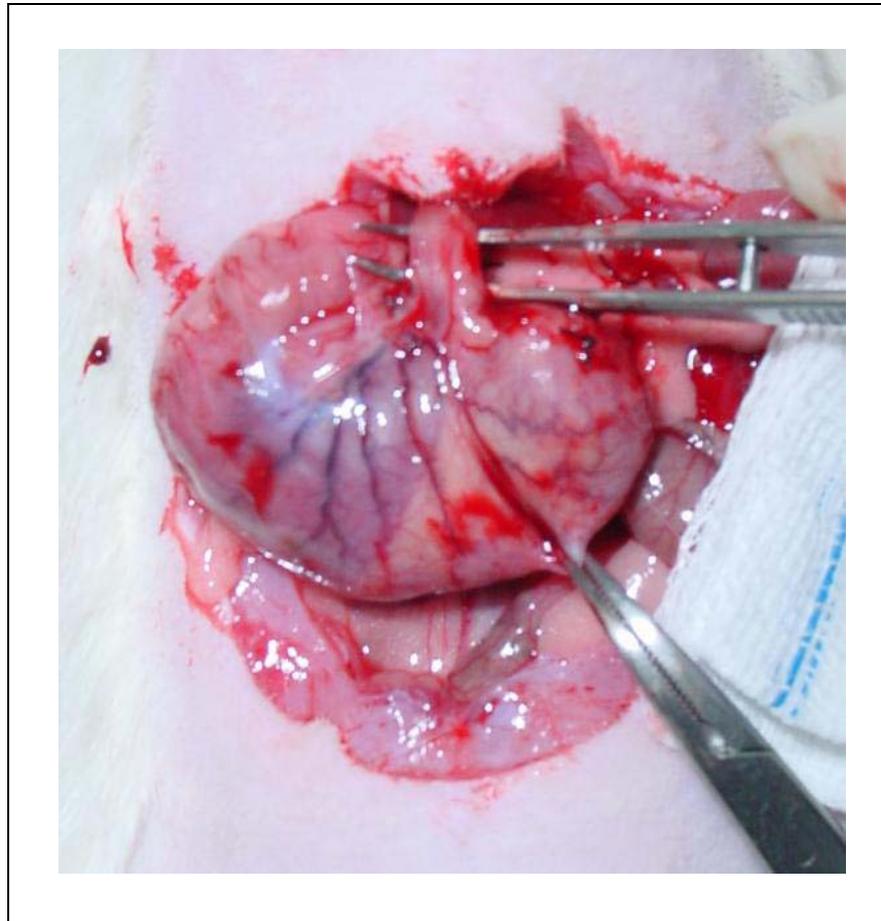


Figura 30. Exposición del esófago.

Se realiza la disección de la arteria hepática y el conducto pancreático (figura 31), lo que permite la exposición de la vena porta (figura 32). Se procede entonces a la ligadura de los vasos de la curvatura mayor gástrica y a la extirpación del estómago tras ligadura duodenal postpilórica (figura 33). El siguiente paso es la disección, ligadura y sección de arteria renal derecha (figura 34). En este momento se disecciona, para posteriormente seccionar la vena mesentérica superior a nivel del ángulo duodeno-yeyunal y se procede a la sección de la tercera porción duodenal en su unión con yeyuno (figura 35). Entonces se retira del

campo operatorio el resto del tubo digestivo. Se continúa con la disección, ligadura y sección de vena suprarrenal izquierda, apertura del peritoneo parietal posterior y disección de aorta abdominal desde su entrada en el abdomen hasta la arteria renal izquierda.

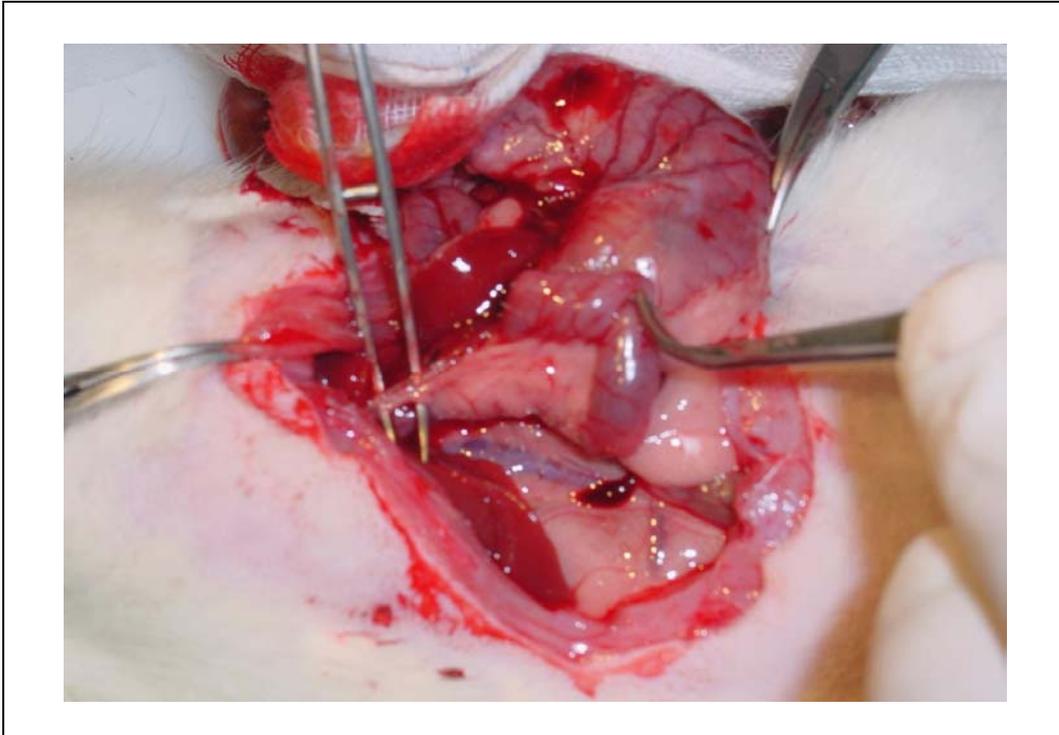


Figura 31. Disección de arteria y conducto hepáticos.

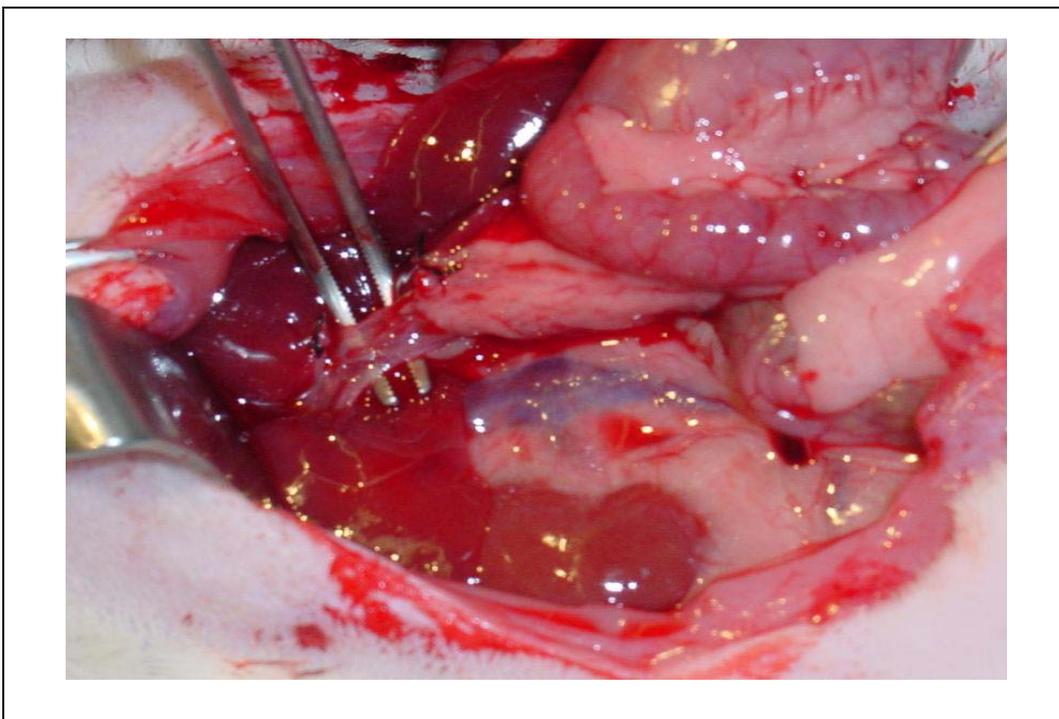


Figura 32. Exposición de la vena porta.

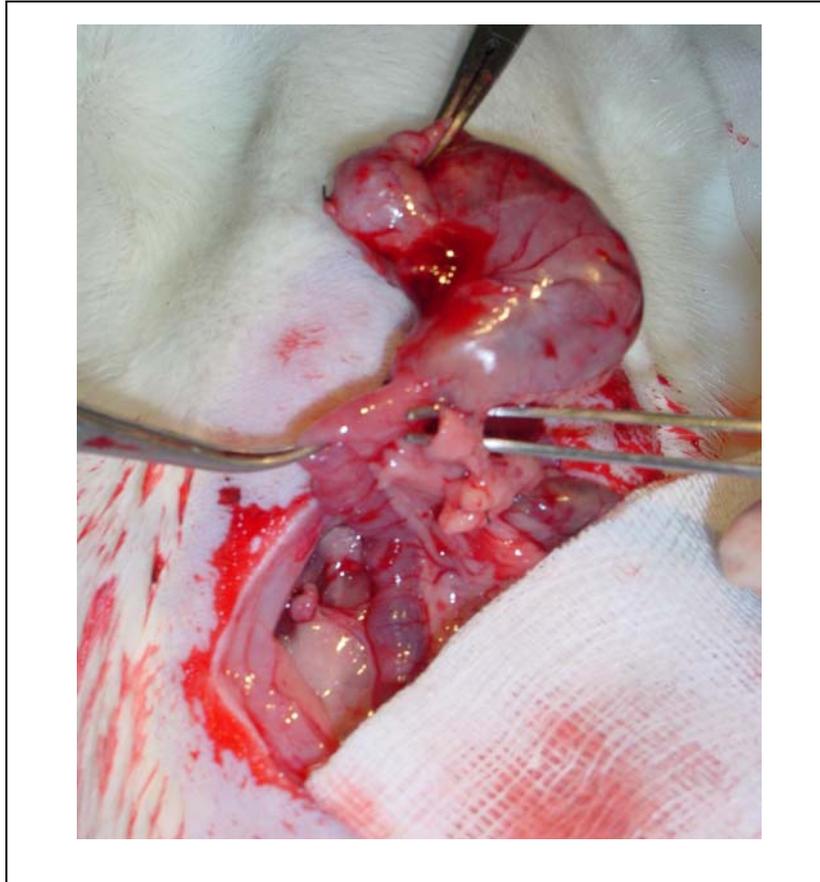


Figura 33. Ligadura de los vasos de la curvatura mayor y extirpación del estómago

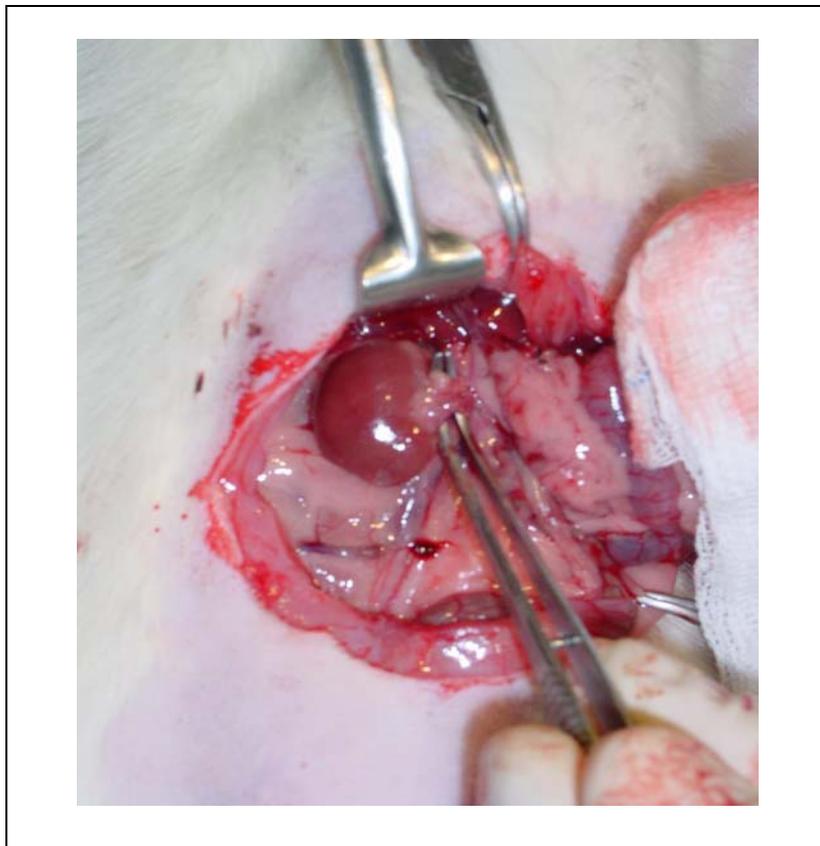


Figura 34. Exposición de arteria renal derecha.

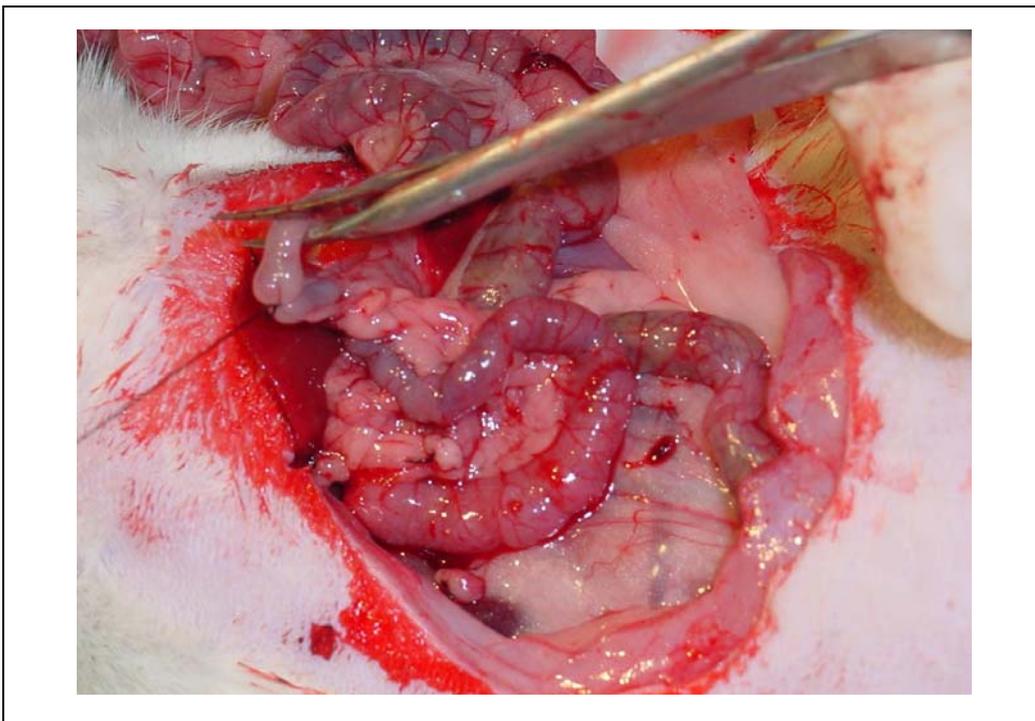


Figura 35. Sección de la unión duodenoyeyunal.

La disección, ligadura y sección de arterias lumbares (figura 36) permite la individualización de un segmento de aorta que incluye el tronco celíaco y la arteria mesentérica superior, los dos aportes vasculares del injerto duodeno-pancreático (figura 37). Se procede a la oclusión de la aorta por encima del tronco celíaco mediante un clamp y a la perfusión del injerto desde un punto inmediatamente inferior a la aorta infrarrenal con 5 cc de solución de Wisconsin (ViaSpan, Bristol-Myers S.A. Madrid) a 4°C (figura 38). Si la perfusión es correcta se produce la palidez inmediata y total del injerto de duodeno-páncreas, procediéndose entonces a la sección de la aorta entre el clamp y el tronco celíaco, sección de la aorta a nivel de su inserción en el parénquima hepático sobre la bifurcación y ligadura del cabo distal de la aorta proximalmente al punto de inyección de la perfusión.

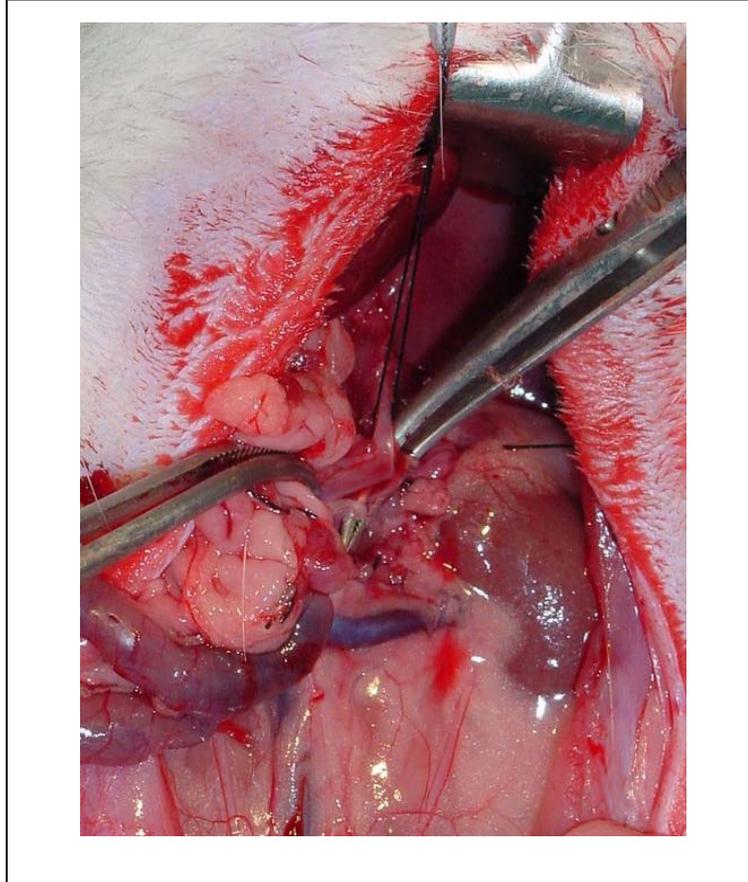


Figura 36. Disección de las arterias lumbares.

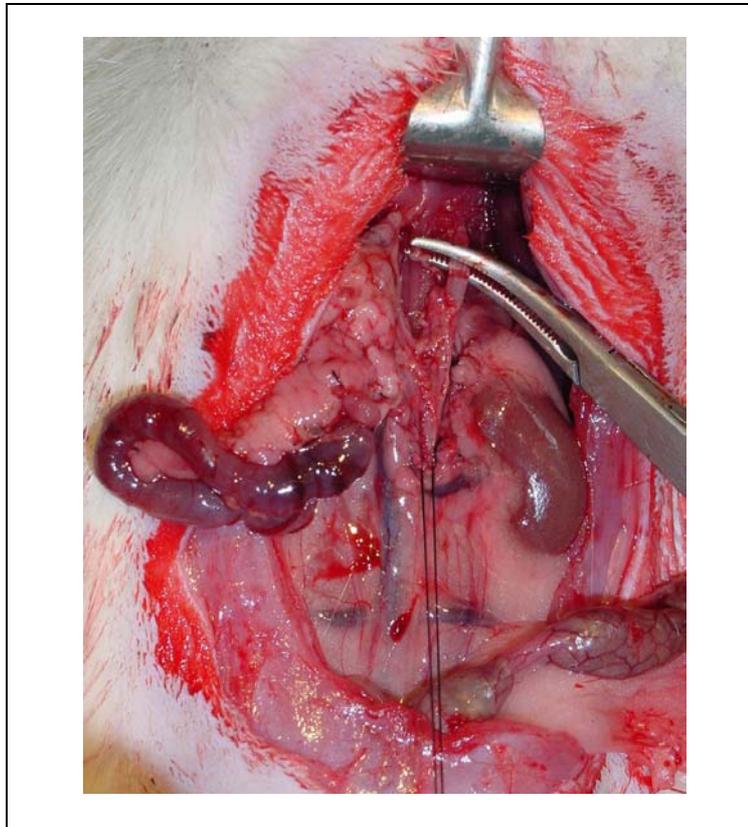


Figura 37. Individualización del segmento aórtico con aporte vascular al páncreas.

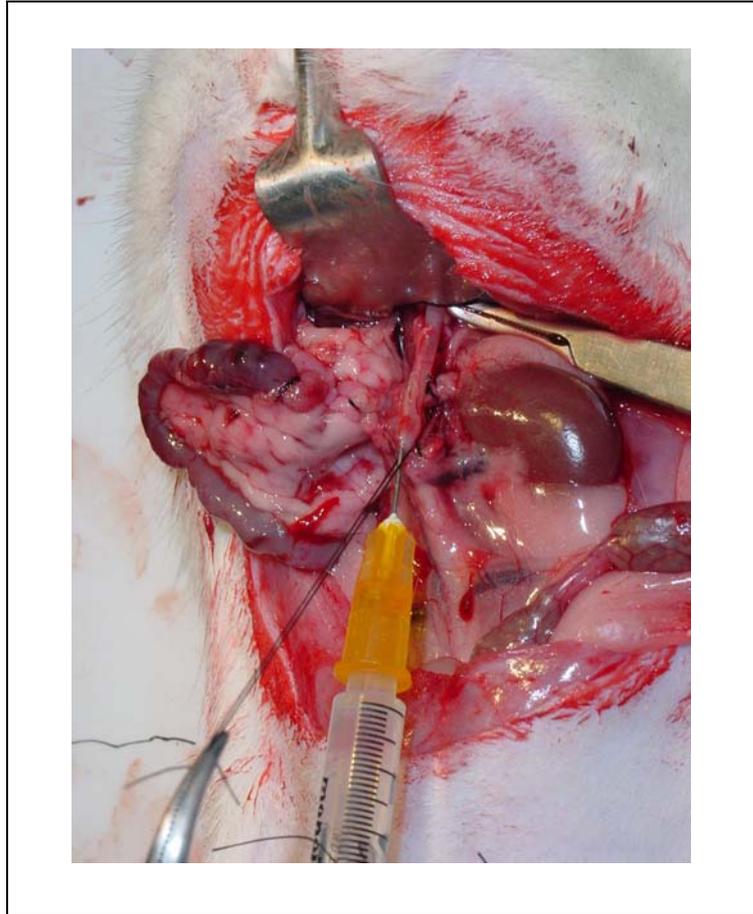


Figura 38. Perfusión del injerto.

El injerto duodeno-pancreático (figura 39) se mantiene almacenado en refrigerador en un recipiente con un baño de solución de Wisconsin a 4° de temperatura, durante unos 30 minutos, tiempo necesario para la preparación del animal receptor.



Figura 39. Injerto de duodeno-pancreas, mostrando la vena porta.

La intervención quirúrgica del implante en el receptor se realiza mediante laparotomía transversa subcostal colocando el injerto en situación heterotópica. Se rechazan el intestino delgado y el colon situándolos fuera del abdomen. Se realiza la disección de la aorta y vena cava infrarrenales, liberando sus planos posteriores e individualizándolas entre si (figura 40).

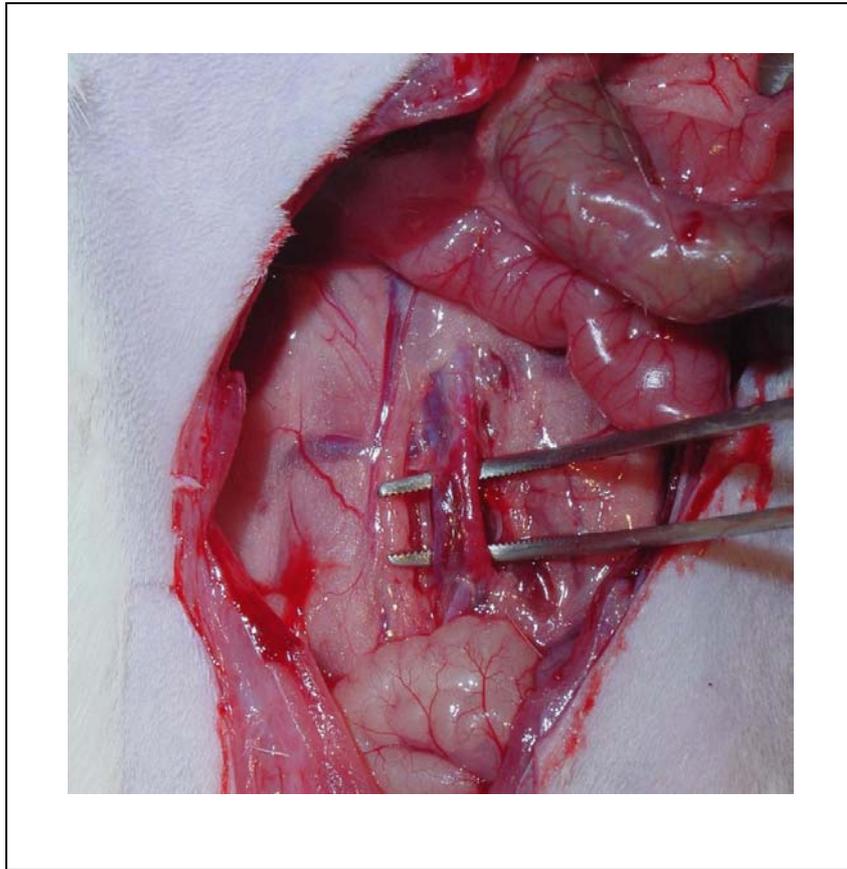


Figura 40. Disección de aorta y cava infrarrenales.

Se coloca un clamp tipo Satinsky que ocluye ambas estructuras vasculares (figura 41) y se procede a la apertura longitudinal de la vena cava inferior y de aorta con bisturí de hoja nº 11 (figura 42). Se realiza la anastomosis vascular termino-lateral entre vena porta del injerto y cava inferior del receptor con suturas continuas de seda (Mersilk®) de 7/0 (figura 43).

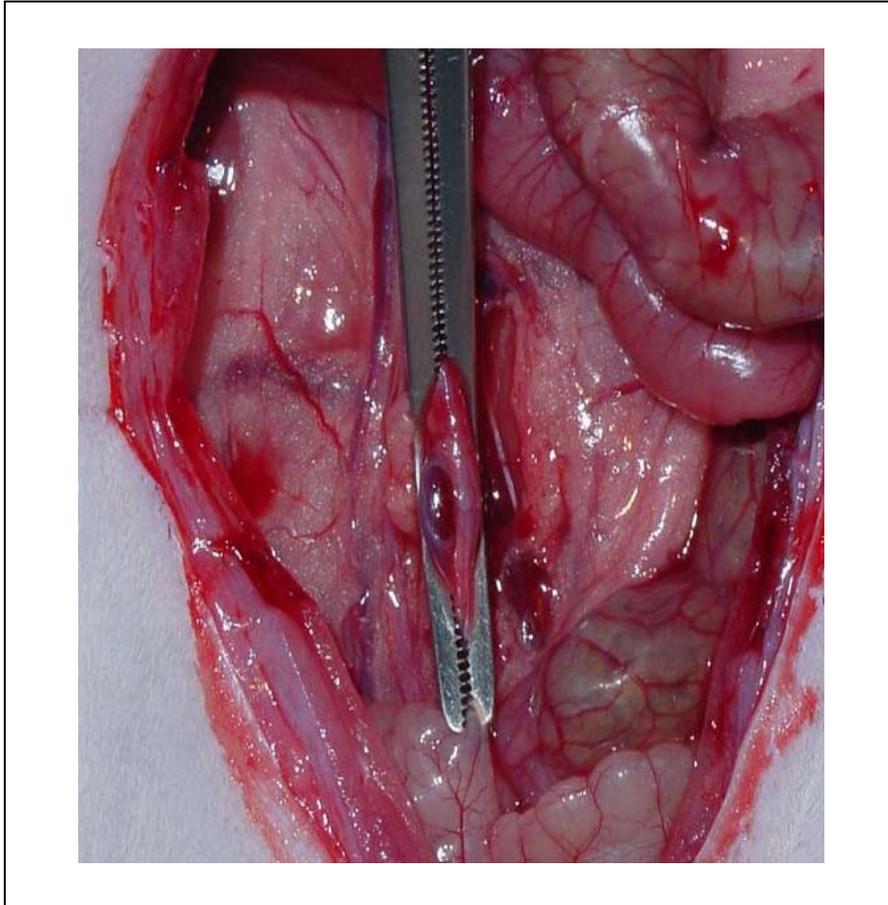


Figura 41. Oclusión vascular de aorta y vena cava inferior.

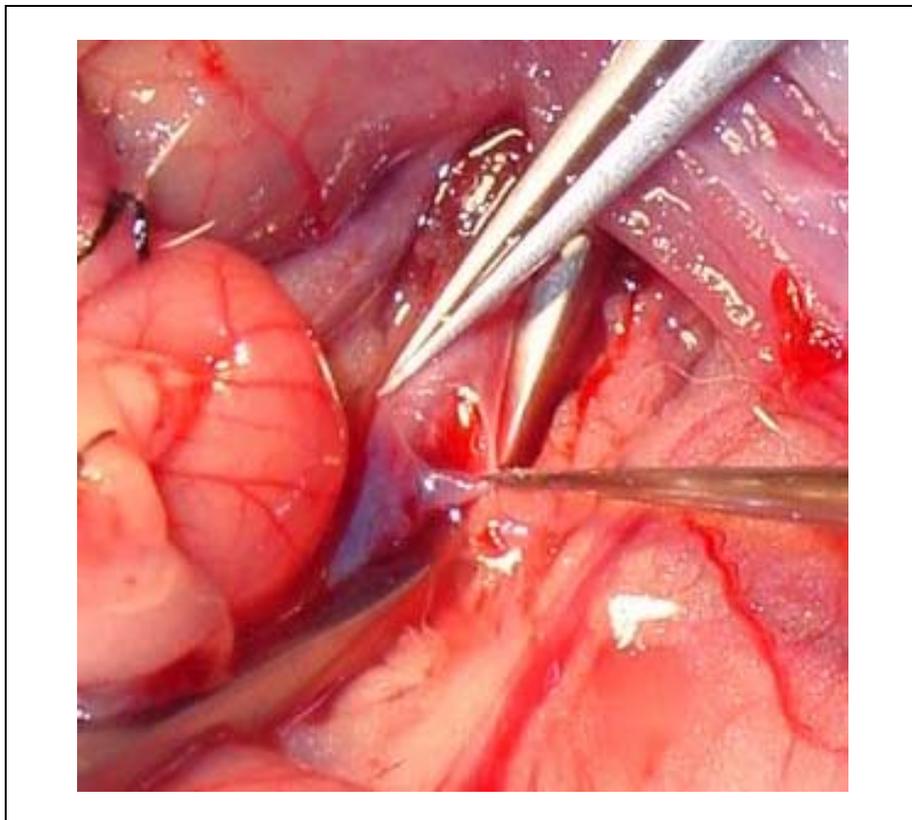


Figura 42. Apertura longitudinal de la cava inferior.

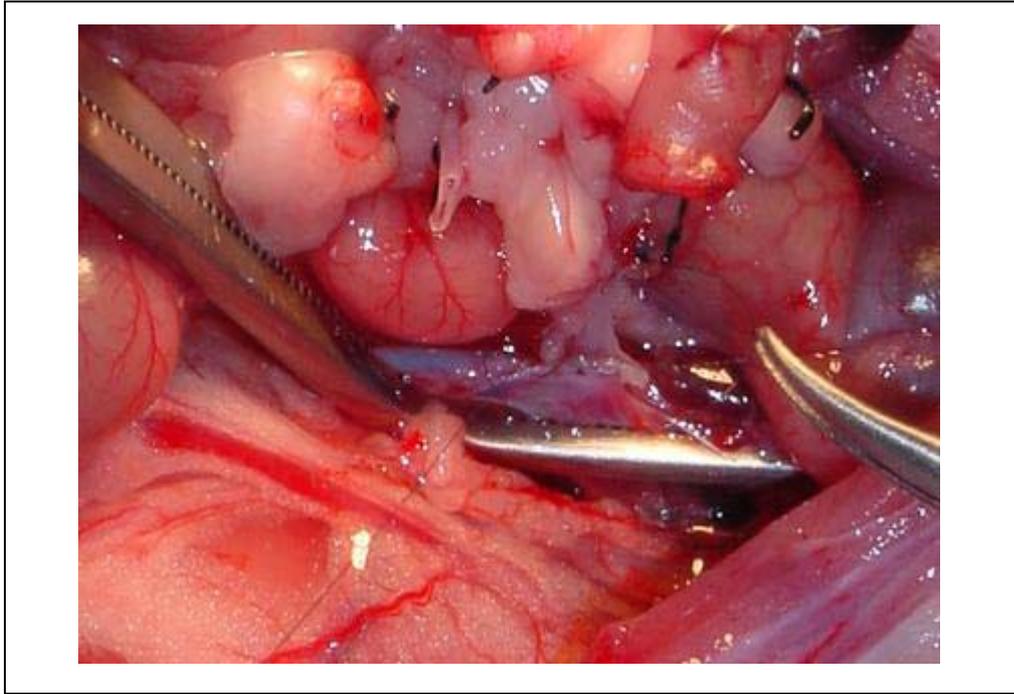


Figura 43. Anastomosis termino-lateral venosa de la porta del injerto con la cava del receptor.

Posteriormente la anastomosis termino-lateral entre la aorta proximal del injerto y la aorta del receptor se realiza con suturas continuas de Prolene 8/0 (figura 44).

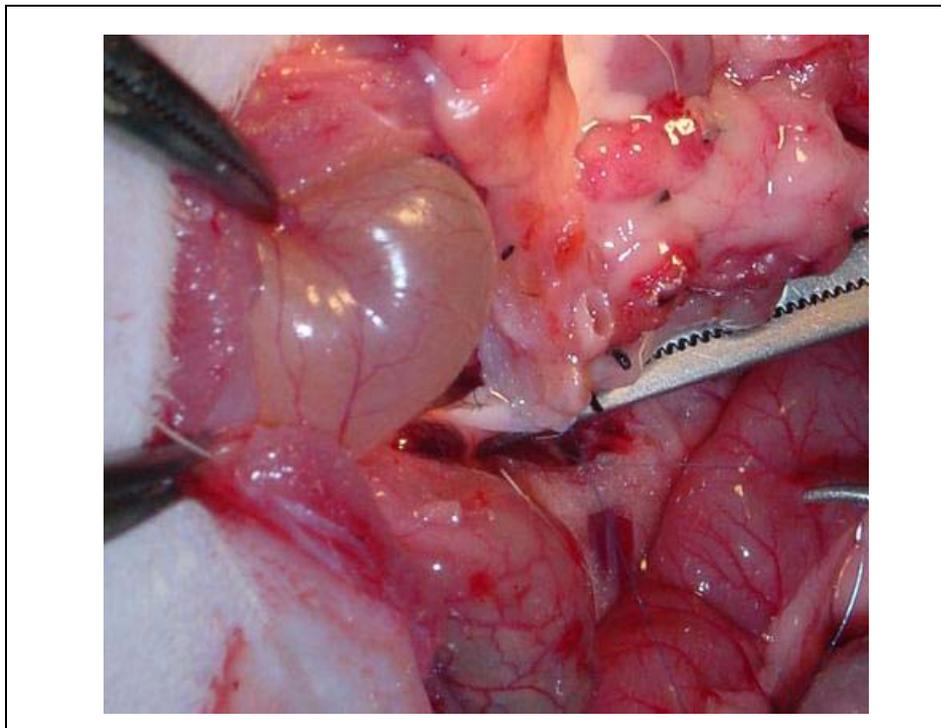


Figura 44. Anastomosis aorto-aórtica termino-lateral.

Para la realización de ambas suturas vasculares se emplea microscopía óptica (Zeiss. Stemi 2000-C). Por último se realiza la anastomosis termino-lateral del extremo distal del duodeno del injerto con un asa yeyunal del receptor mediante sutura con seda 5/0. Una vez realizado el procedimiento se retira el clamp vascular y se inicia la reperfusión (figura 45). En ocasiones es necesario realizar hemostasia mediante aplicación de gasa. Por último se cierra la laparotomía con puntos sueltos de seda 2/0.

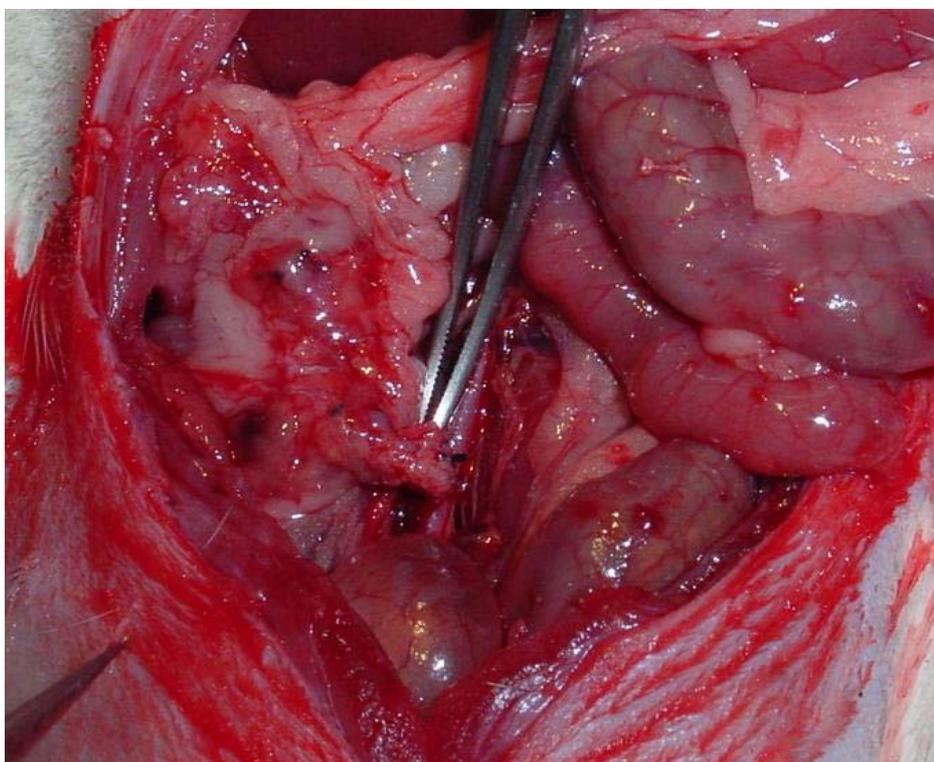


Figura 45. Reperfusión del injerto duodeno-pancreático.

#### **4.4 Cálculo del tamaño muestral**

Como en otros ensayos precedentes realizados por nuestro grupo, se ha escogido como variable más significativa para el cálculo del tamaño

de la muestra a la lipasa plasmática. El cálculo se ha basado en la comparación de los niveles de lipasa plasmática entre los diferentes grupos. Datos de estudios previos sobre la lipasa media estimada (600 U/ml) y la desviación estándar (200 U/ml) del grupo control sugieren una escala logarítmica de las oscilaciones de esta variable, siendo por tanto necesaria una estimación de las medias geométricas y las desviaciones estándar.

Con la información de que se dispone se asume que la media geométrica es aproximadamente igual al logaritmo de la media aritmética, y la desviación estándar era igual al coeficiente de variación (desviación estándar/media) de la variable sin transformar<sup>337</sup>. Por tanto, las asunciones de las variables transformadas logarítmicamente para el cálculo de la muestra son las siguientes: media estimada en el grupo control  $\approx 6'40$ , y desviación estándar del grupo control  $\approx 0'33$ .

Bajo la asunción de distribución normal y comparabilidad de varianzas podemos aceptar diferencias para valores observados en los grupos con pancreatitis superiores o iguales a la media del grupo control  $\pm 2$  desviaciones estándar. Por tanto, la diferencia mínima que aceptaremos como significativa será  $0'67$  (lo que representa unos niveles de lipasa en el grupo de pancreatitis  $\leq 1500$  U/ml, aproximadamente).

La muestra mínima necesaria, bajo las asunciones anteriores y con un error alfa global del 5% entre las comparaciones posibles y aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, contraste bilateral de hipótesis y una potencia del 90% (error beta: 10%), es de 8 ratas por grupo. Los cálculos se han realizado según la metodología

descrita por Fleiss<sup>338</sup> y utilizando el programa estadístico Stata (Stata Corp. 1999. Stata Statistical Software: Release 6.0 College Station, TX: Stata Corporation).

## **4.5 Grupos experimentales**

### **4.5.1 Grupo 1 (C):**

**Control.** Bajo anestesia general y tras practicar laparotomía transversa se procede a canular el conducto pancreático a través del duodeno. El conducto hepático se ocluye con un pequeño *bulldog* y se realiza la inyección intraductal de suero salino al 0,9% en un volumen de 0,1 ml/100gr mediante bomba de infusión Harvard 22 (Harvard Instruments, Edenbridge, UK) a 0,3 ml/min. A las 3 horas del procedimiento se lleva acabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

### **4.5.2 Grupo 2 (P):**

**Inducción de pancreatitis.** Bajo anestesia general se practica laparotomía transversa, se canula el conducto pancreático y se genera una pancreatitis en el animal de experimentación mediante la inyección intraductal de taurocolato sódico al 5% (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) en un volumen de 0,1 ml/100gr de peso empleando bomba de infusión a 0,3 ml/min<sup>269</sup>. A las 3 horas del procedimiento se lleva acabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

#### 4.5.3 Grupo 3 (ST):

***Simulación de trasplante mediante oclusión vascular.*** Tras la realización de laparotomía transversa bajo anestesia general se procede a la disección de la arteria aorta y vena cava infrarrenales, colocando un clamp de Satinsky que produce la oclusión total del flujo sanguíneo durante 40 minutos (tiempo estimado de la realización del implante en los grupos de trasplante) y después de lo cual se retira el clamp y se da por terminado el procedimiento. A las 3 horas del mismo se lleva a cabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

#### 4.5.4 Grupo 4 (STP):

***Simulación de trasplante mediante oclusión vascular con inducción de pancreatitis.*** De forma idéntica al grupo anterior se realiza una oclusión vascular de arteria aorta y vena cava durante 40 minutos. Acto seguido se procede a inducir la pancreatitis mediante la inyección intraductal de taurocolato sódico al 5% como se describe en el grupo 2. A las 3 horas se lleva a cabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

#### 4.5.5 Grupo 5 (T):

***Isotrasplante pancreático.*** Se realiza la extracción del injerto duodeno-pancreático en el donante previo al sacrificio del animal y se procede a su implantación heterotópica en el animal receptor tras aproximadamente 30 minutos de conservación en solución de Wisconsin a 4°C. Para ello se realizan anastomosis vasculares mediante microscopía óptica (Zeiss.

Stemi 2000-C). A las 3 horas del procedimiento se lleva acabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

#### **4.5.6 Grupo 6 (TPN):**

***Isotrasplante pancreático e inducción de pancreatitis en órgano nativo.*** Tras la realización del isotrasplante se procede a la inducción de la pancreatitis sobre el órgano nativo del animal, del mismo modo al realizado en el grupo 2. A las 3 horas del procedimiento se lleva acabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

#### **4.5.7 Grupo 7 (TPI):**

***Isotrasplante pancreático e inducción de pancreatitis sobre el injerto.*** Se realiza el isotrasplante y posteriormente se genera la pancreatitis, del mismo modo ya descrito, a través del conducto pancreático del injerto. A las 3 horas del procedimiento se lleva acabo la obtención de muestras y el sacrificio del animal (n=8).

### **4.6 Obtención y procesamiento de las muestras**

La obtención de las muestras se realiza al cabo de 3 horas de realizar los procedimientos quirúrgicos. Este tiempo es el necesario para objetivar las manifestaciones sistémicas a nivel pulmonar tras la inducción de la pancreatitis aguda con ácido taurocólico<sup>334</sup>. Se procede a la reapertura de la laparotomía. Se realiza extracción de 1cc de sangre venosa a nivel de vena cava inferior por encima de las venas renales. Posteriormente se extrae la misma cantidad a nivel de venas

suprahepáticas. Ambas muestras se colocan en tubos de ensayo heparinizados y en frío. Posteriormente se toman muestras tisulares de páncreas nativo e injerto pancreático, así como de hígado y pulmón, que son inmediatamente congeladas en nieve carbónica, manteniéndose en congelador a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para determinaciones enzimáticas. Por separado se toman muestras tisulares de cada uno de los órganos y se colocan en formol para su posterior análisis histológico. Una vez obtenidas las muestras se sacrifica al animal.

Las muestras sanguíneas se centrifugan a 3000 revoluciones por minuto, a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se obtiene el sobrenadante que se guarda en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

## **4.7 Determinaciones enzimáticas**

### **4.7.1 Determinaciones plasmáticas**

#### **4.7.1.1 Lipasa**

La lipasa es una enzima digestiva secretada por el páncreas que hidroliza los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. En el caso de una pancreatitis aguda, esta enzima se encuentra en elevadas concentraciones en plasma, lo que permite utilizarla como un marcador de lesión pancreática. Para su determinación se utilizó un ensayo de lipasa (Randox Laboratories; UK) que mediante un método turbidimétrico mide la siguiente reacción:



Con un estándar de la enzima lipasa, la muestra (plasma) y el substrato de reacción, el ensayo mide la disminución de la turbidez en la muestra a una longitud de onda de 340 nm. La actividad de las muestras se obtiene en U/l aplicando la fórmula:

$$\text{U/l} = \frac{\text{Actividad}_{\text{estándar}} \times \Delta E_{\text{muestra}}}{\Delta E_{\text{estándar}}}$$

#### **4.7.1.2 Receptor soluble 1 y 2 del TNF $\alpha$**

Los niveles circulantes del receptor soluble 1 y 2 del TNF $\alpha$  se determinaron usando un ensayo ELISA con un kit comercial de la casa R&D Systems (Mineapolis, MN, USA).

### **4.7.2 Determinaciones tisulares**

#### **4.7.2.1 Proteínas**

La valoración de proteínas se realizó con un ensayo de la casa BioRad (Richmond, California, USA). Se basa en el cambio de color que presenta un colorante en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El colorante que se utiliza es una solución ácida de Azul de Coomasie. A una longitud de onda de 545 nm, se mide el cambio de absorbancia que sufre el Azul de Coomasie al unirse a proteínas.

#### **4.7.2.2 Mieloperoxidasa**

La mieloperoxidasa es una enzima presente en los gránulos de los neutrófilos polimorfonucleares, que puede llegar a representar el 5% del peso de la célula y que se utiliza como marcador de la presencia de estas

células en un tejido inflamado. Esta enzima, sin embargo, también está presente en otros tipos celulares (monocitos). Su función es destruir los microorganismos fagocitados, o bien, liberada al exterior, crear un ambiente tóxico en la zona infectada. El neutrófilo genera grandes cantidades de radical superóxido, que se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (SOD). Entonces, este peróxido de hidrógeno se aprovecha para reaccionar con cloruro y formar ácido hipocloroso, un potente oxidante con gran capacidad citotóxica.

La reacción catalizada por la mieloperoxidasa *in vivo* es la siguiente:



El método de medición se basa en la reacción de la tetrametilbenzidina (TMB) catalizada por la mieloperoxidasa<sup>334</sup>. La TMB es un análogo no cancerígeno de la *o*-dianisidina que se utilizaba originalmente. Con un tampón de reacción conteniendo peróxido de hidrógeno y TMB, la mieloperoxidasa presente en la muestra cataliza la reacción de reducción de la TMB resultando un producto de color azul. La medida del incremento de color se realiza espectrofotométricamente a 620nm de longitud de onda.

#### 4.7.2.3 TNF $\alpha$ m-RNA, IL-6 mRNA y HSP mRNA

Los niveles de expresión del mRNA de estos mediadores y enzimas se determinan por RT-PCR. El RNA total se extrae por homogenización del tejido con TRIzol<sup>®</sup>. El RNA se cuantifican y su calidad se evalúan en gel de agarosa. A continuación, el RNA se amplifica usando los correspondientes oligonucleótidos y el kit One Step RT-PCR

de la casa Gibco. El cDNA amplificado se visualiza en geles de agarosa y la intensidad de las bandas se determina densitométricamente. La expresión de  $\beta$ -actina se usa como marcador. La tabla 3 muestra los oligonucleótidos para la RT-PCR.

Tabla 3. Oligonucleótidos para RT-PCR

	5'	3'
TNF	5-ACT-GAA-CTT-CGG-GGT-GAT-TG-3	5-GTG-GGT-GAG-GAG-CAC-GTA-GT-3
IL6	5-CCG-GAG-AGG-AGA-CTT-CAC-AG-3	5-GAG-CAT-TGG-AAG-TTG-GGG-TA-3
HSP70	5-CAG-AGA-GTC-GAT-CTC-CAG-GC-3	5-AGG-AGA-TCT-CGT-CCA-TGG-TG-3
$\beta$ -Actina	5-CAC-GGC-ATT-GTA-ACC-AAC-TG-3	5-TCT-CAG-CTG-TGG-TGG-TGA-AG-3

#### **4.8 Estudio histológico**

Las muestras de tejido no congeladas fueron procesadas según el procedimiento estándar para ser observadas por microscopia óptica. Inmediatamente después de la extracción del organismo, las muestras se fijan durante un mínimo de 24 horas en una solución tamponada de formol al 10%. Se incluyen en parafina, se cortan a un grosor de 5  $\mu$ m y se tiñen con hematoxilina-eosina para el posterior examen al microscopio. En la valoración de las muestras se consideró la presencia de edema, de inflamación y necrosis en páncreas y de hiperemia, infiltración de neutrófilos y engrosamiento de las paredes alveolares en pulmón.

## **4.9 *Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico descriptivo de las variables cuantitativas continuas, los resultados se expresan en forma de media  $\pm$  error estándar de la media. Se realiza una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para las variables obtenidas. En caso de hallarse distribuciones normales las medias se comparan mediante la prueba de Levene para la igualdad de las varianzas y posteriormente con la T de Student determinándose el nivel de significación estadística con una  $p < 0.05$ . En caso de no presentar una distribución normal las variables se comparan mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los cálculos estadísticos se realizan mediante el programa SPSS for Windows, versión 11.5.1, SPSS Inc, Chicago, IL. 1991-2000.



---

## **5 Resultados**

### ***5.1 Estudio de la respuesta local y sistémica, a nivel hepático y pulmonar, producida tras la inducción de una pancreatitis aguda por administración intraductal de taurocolato sódico y tras la realización de un isotrasplante pancreático heterotópico experimental.***

#### **5.1.1 Niveles de lipasa plasmática**

Los niveles de lipasa plasmática en U/L, expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se exponen en la tabla 4. La figura 46 ilustra los citados niveles, obtenidos a las 3 horas del experimento, en los grupos de pancreatitis (P) y de trasplante isogénico (T), en referencia a los diferentes grupos control.

Tabla 4. Valores medios de lipasa plasmática  $\pm$  error estándar de la media en Unidades/Litro para todos los grupos. C= control, P= pancreatitis, ST= simulación de trasplante, STP= simulación de trasplante y pancreatitis, T= trasplante, TPN= trasplante y pancreatitis en páncreas nativo, TPI= trasplante y pancreatitis en injerto.

Grupos	Media de lipasa plasmática U/L	Error estándar de la media U/L
1(C)	354	88
2 (P)	2494	498
3 (ST)	21	7
4 (STP)	2220	403
5 (T)	558	106
6 (TPN)	3506	578
7 (TPI)	2635	193

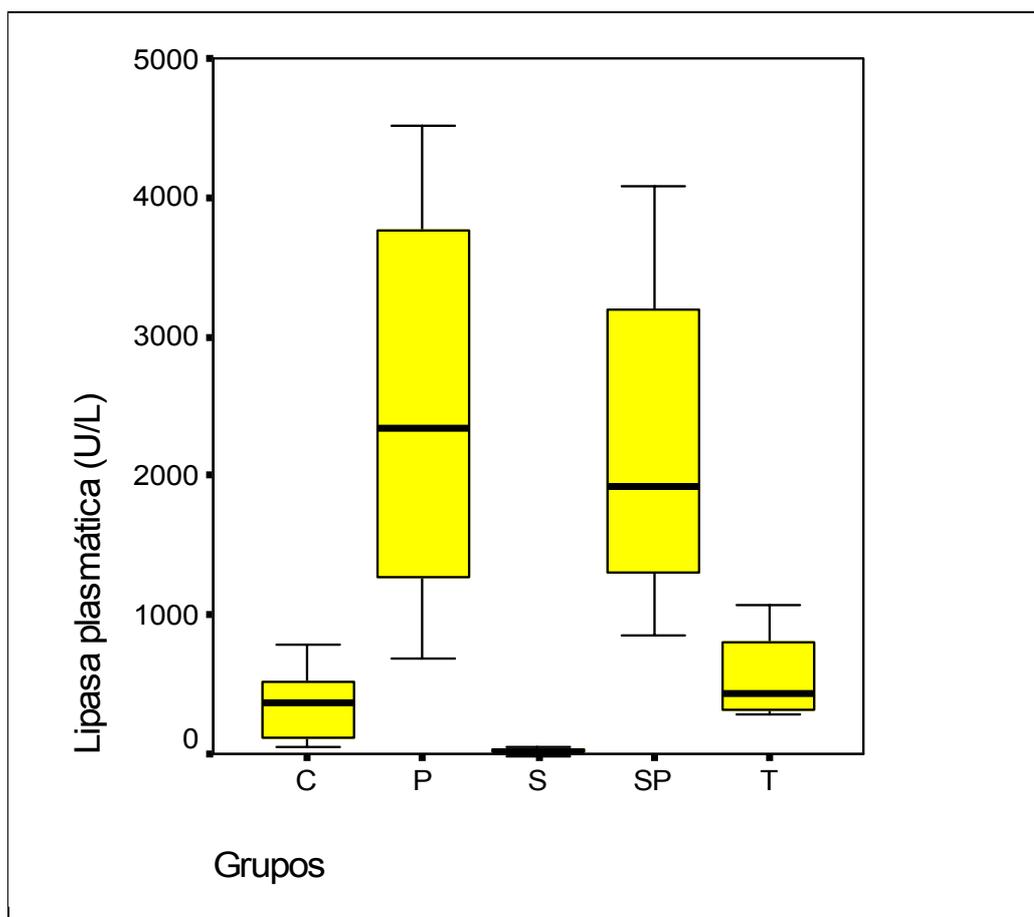


Figura 46. Niveles de lipasa plasmática en grupos control (C), pancreatitis (P), simulación de trasplante (ST, STP) y trasplante (T).

Se puede apreciar que en los grupos control (C), simulación de trasplante (ST) y trasplante pancreático (T) los niveles de lipasa se mantienen en rangos considerados normales, por debajo de 600 U/l. Los grupos C y T presentan valores de lipasa similares entre sí ( $p=0'162$ ) y aumentados de forma estadísticamente significativa frente al grupo ST, con una  $p=0'001$  para ambos casos. Los niveles de lipasa en los grupos con pancreatitis presentan una elevación estadísticamente significativa respecto a sus controles sin pancreatitis (C vs. P  $p=0'001$ ; ST vs. STP  $p=0'0005$ ). No existen diferencias significativas al comparar entre ellos los diferentes grupos con pancreatitis. (P vs. STP  $p=0'677$ ). **El grupo de pancreatitis presenta una elevación estadísticamente significativa de la lipasa plasmática en comparación con el grupo de trasplante ( $p=0'002$ ).**

### 5.1.2 Niveles de mieloperoxidasa pancreática

Los niveles de MPO en páncreas para los grupos C, P, ST, STP y T se ilustran en la figura 47. La expresión de los mismos en mU/mg de proteína como media  $\pm$  error estándar de la media de cada grupo se muestran en la tabla 5. Se aprecia una elevación estadísticamente significativa de los niveles de MPO pancreática entre el grupo control y la pancreatitis (C vs. P  $p=0'014$ ). La realización de un clampaje vascular no modifica los niveles de MPO pancreática respecto al control (C vs. ST  $p=0'91$ ), y su presencia tampoco supone diferencias si se realiza pancreatitis asociada al compararla con la pancreatitis (P vs. STP  $p=0'5$ ). Sin embargo, existe diferencia en ambos grupos de clampaje vascular por la presencia de pancreatitis asociada (ST vs. STP  $p=0'01$ ).

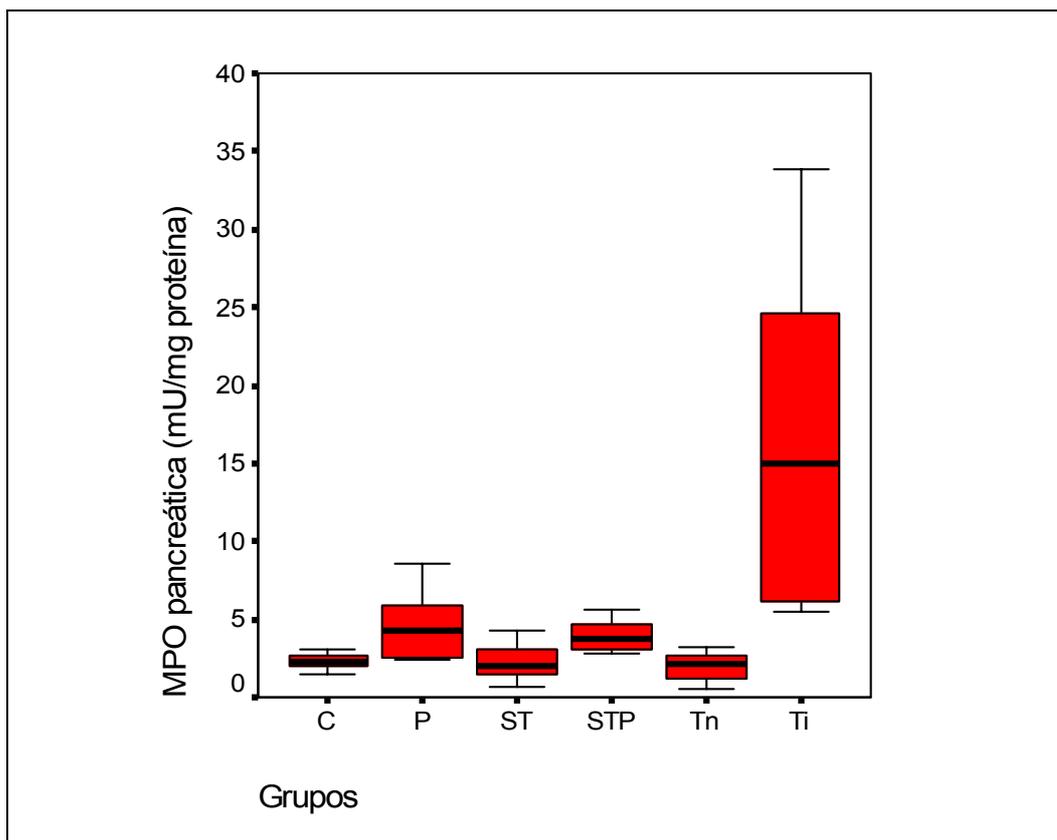


Figura 47. Valores de MPO pancreática en mU/mg proteína para los grupos control (C), pancreatitis (P), simulación de trasplante (ST), simulación de trasplante y pancreatitis (STP), y trasplante, tanto para el órgano nativo (Tn) como para el injerto (Ti).

Grupos	Media de MPO pancreática mU/mg proteína	Error estándar de la media
1(C)	2'29	0'19
2 (P)	4'53	0'77
3 (ST)	2'24	0'42
4 (STP)	3'93	0'37
5 (Tn)	1'96	0'33
5 (Ti)	16'30	3'70
6 (TPNn)	4'89	0'70
6 (TPNi)	15'21	3'25
7 (TPIIn)	2'53	0'47
7 (TPIIi)	22'89	4'33

Tabla 5. Valores medios de MPO pancreática  $\pm$  error estándar de la media en mU/mg de proteína en todos los grupos. En los grupos de trasplante (n= órgano nativo, i= injerto).

La realización de un trasplante supone un incremento estadísticamente significativo de la MPO en el injerto pancreático respecto del nivel de MPO en la pancreatitis (grupo P vs. grupo Ti  $p=0'007$ ). No existen variaciones en el órgano nativo del animal trasplantado (C vs. Tn  $p=0'401$ ).

### 5.1.3 Niveles de mieloperoxidasa pulmonar

Los niveles de MPO en pulmón en los grupos control, pancreatitis y trasplante se muestran en la figura 48. La expresión de los mismos en forma de media  $\pm$  error estandar de la media se exponen en la tabla 6.

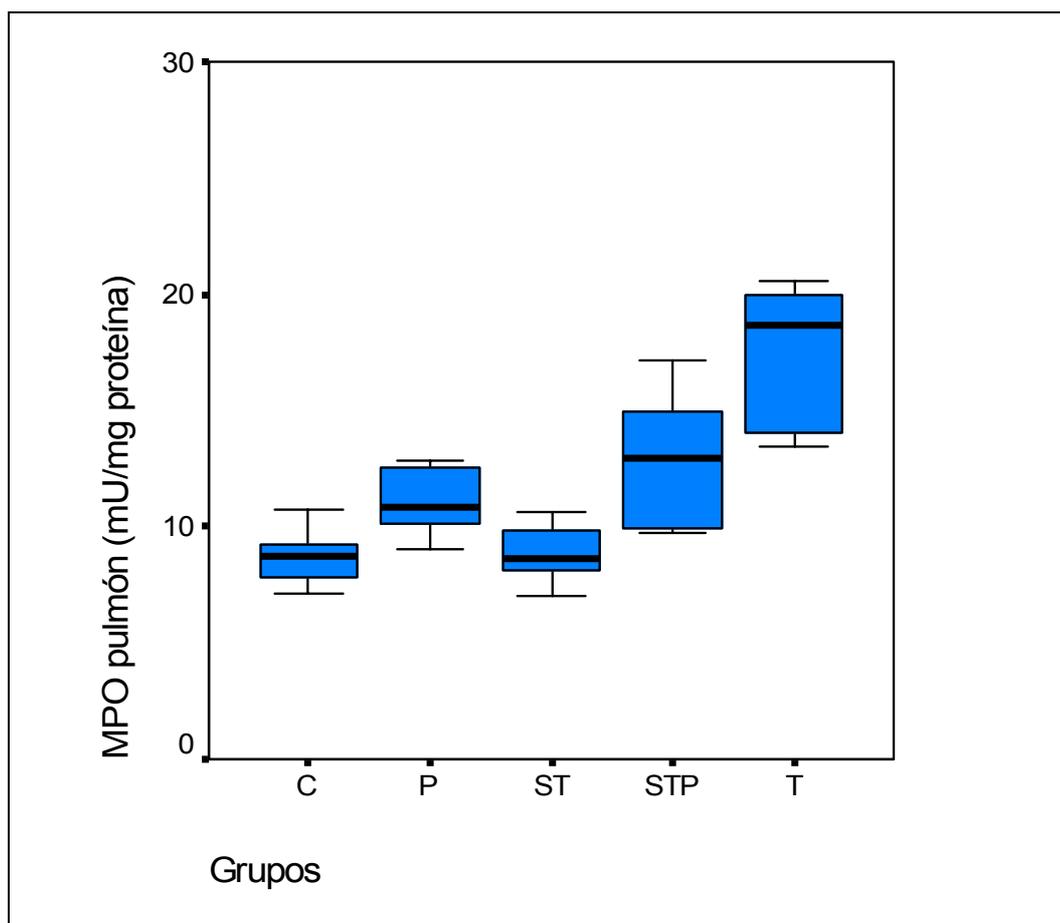


Figura 48. Valores de MPO pulmonar en los grupos control (C), pancreatitis (P), simulación de trasplante (ST), simulación de trasplante con pancreatitis(STP), y trasplante(T).

Tabla 6. Valores medios de mieloperoxidasa en pulmón  $\pm$  error estándar de la media en mU/mg proteína para todos los grupos a estudio.

Grupos	Media de MPO en pulmón mU/mg proteína	Error estándar de la media
1(C)	8'6	0'4
2 (P)	11'5	0'8
3 (ST)	8'8	0'4
4 (STP)	12'8	1
5 (T)	18'6	1'9
6 (TPN)	17'4	1'8
7 (TPI)	14'8	0'6

Se observa un incremento estadísticamente significativo en los niveles de MPO pulmonar entre los grupos control y pancreatitis (C vs. P  $p=0'01$ ). El grupo control no presenta diferencias respecto al grupo de simulación de trasplante (C vs. ST  $p=0'750$ ) **La realización de un trasplante implica un importante incremento de la MPO pulmonar respecto al grupo control (C vs. T  $p=0'0005$ ), e incluso respecto al grupo con pancreatitis (P vs. T  $p=0'004$ ).**

#### **5.1.4 Niveles plasmáticos de receptores solubles 1 y 2 del TNF $\alpha$**

Los niveles plasmáticos de Rs<sub>1</sub>-TNF $\alpha$  a nivel de circulación periférica (cava inferior) en los grupos control, pancreatitis y trasplante se muestran en la figura 49. Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se muestran en la tabla 7.

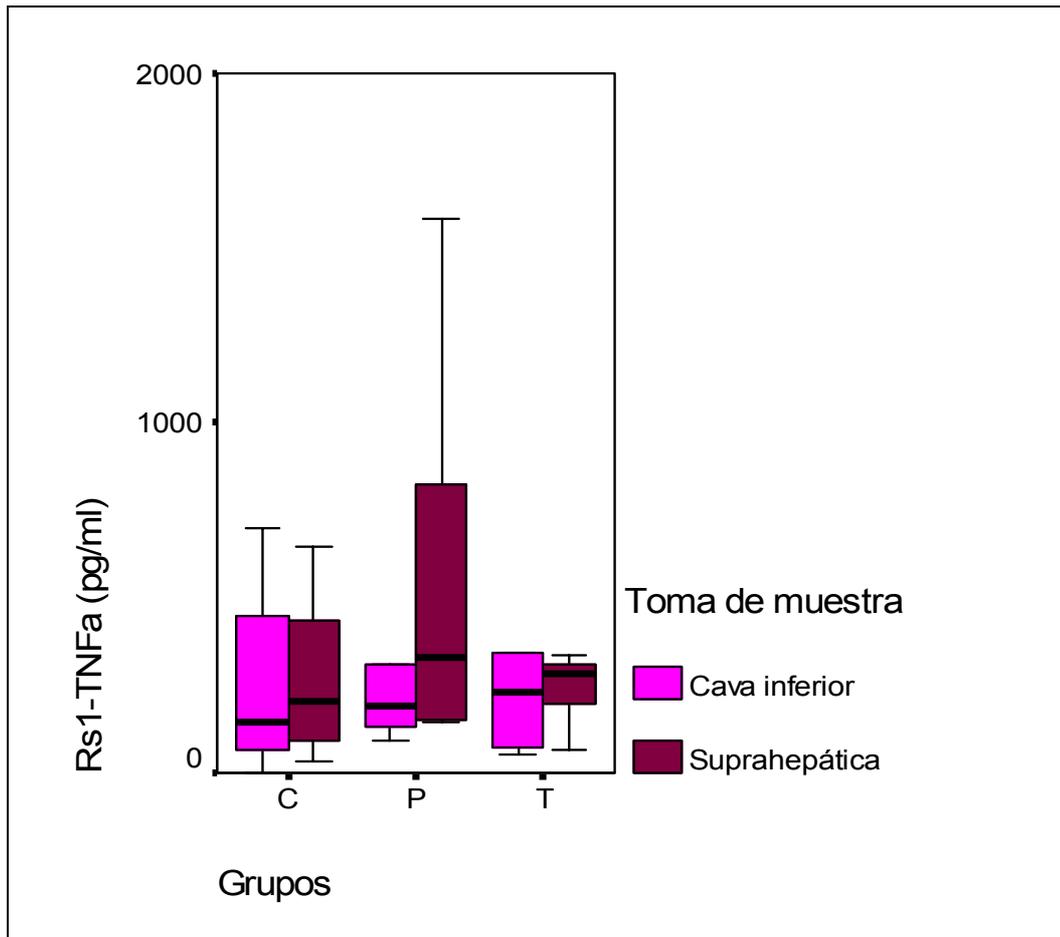


Figura 49. Valores de  $Rs_1$ -TNF $\alpha$  en los grupos control (C), pancreatitis (P) y trasplante (T) para extracciones sanguíneas a nivel de vena cava y vena suprahepática.

Grupos	Media de $Rs_1$ -TNF $\alpha$ en pg/ml	Error estándar de la media
1 (Cc)	251'5	110'2
1 (Cs)	268'7	56'1
2 (Pc)	446'8	265'7
2 (Ps)	560	228'5
5 (Tc)	212'2	56'1
5 (Ts)	247'6	44'3

Tabla 7. Valores plasmáticos medios de  $Rs_1$ -TNF $\alpha$   $\pm$  error estándar de la media a nivel de vena cava inferior (c) y vena suprahepática (s) en pg/ml para los grupos control (C), pancreatitis (P) y trasplante (T).

No existen diferencias significativas entre los tres grupos (C, P y T) en cuanto a los niveles del receptor a nivel sistémico (C vs P  $p= 0'423$ ; C vs T  $p= 0'759$ ; P vs T  $p= 1$ ). La comparación de los niveles de  $Rs_1$ -TNF $\alpha$  en cava inferior y en las venas suprahepáticas no muestran diferencias en los grupos control y trasplante. Sin embargo, en el grupo de pancreatitis se aprecia un incremento del 25% en los niveles del receptor a nivel de venas suprahepáticas.

Los niveles plasmáticos de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$  a nivel de circulación periférica en los grupos control, pancreatitis y trasplante se muestran en la figura 50. Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se muestran en la tabla 8.

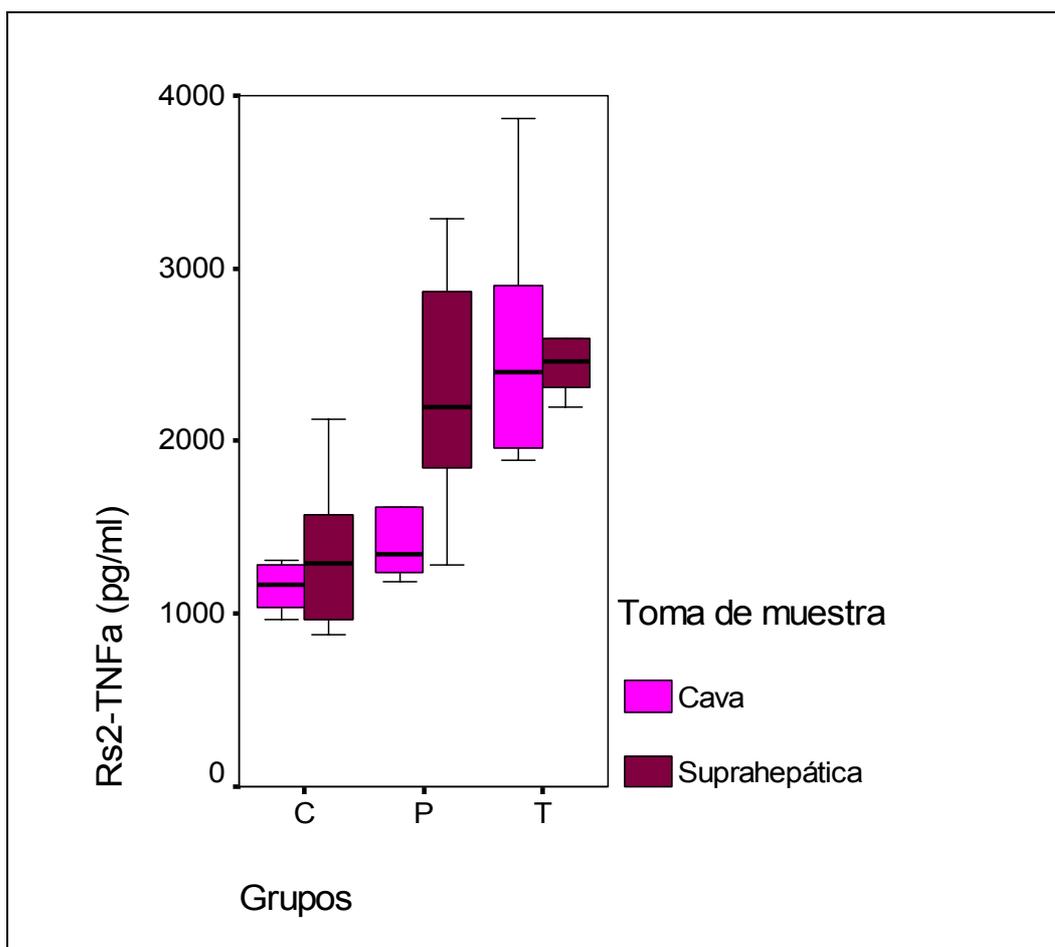


Figura 50. Valores de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$  en los grupos control (C), pancreatitis (P) y trasplante (T) medidos a nivel de vena cava y vena suprahepática.

Tabla 8. Valores plasmáticos medios de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$   $\pm$  error estándar de la media en pg/ml para los grupos control (C), pancreatitis (P) y trasplante (T). (c= vena cava inferior, s= vena suprahepática).

Grupos	Media de $Rs_2$ -TNF $\alpha$ en pg/ml	Error estándar de la media
1 (Cc)	1155	60
1 (Cs)	1355	184
2 (Pc)	1618	279
2 (Ps)	2278	292
5 (Tc)	2570	300
5 (Ts)	2557	161

A nivel de cava inferior, los niveles de este receptor en los grupos control y pancreatitis no difieren de forma significativa ( $p=0'065$ ). Sin embargo, los niveles en el grupo de trasplante son muy superiores a los del grupo control ( $p=0'001$ ) y a los de la pancreatitis ( $p=0'037$ ). Al comparar los niveles entre los dos puntos de toma de muestra observamos que no hay diferencias en el grupo control ( $p=0'344$ ), ni en el grupo pancreatitis ( $p=0'109$ ), ni en el grupo de trasplante ( $p=0'97$ ). En el grupo pancreatitis existe un incremento del 29% de los niveles de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$  a nivel de venas suprahepáticas.

### 5.1.5 Niveles hepáticos de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70

La figura 51 muestra la expresión hepática del mRNA del TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70 en los grupos control, pancreatitis y trasplante determinados por RT-PCR. En el grupo control se aprecia la ausencia de trazador para las tres proteínas. El grupo de pancreatitis expresa de un modo intenso el

mRNA de la HSP 70, y en menor medida el de TNF $\alpha$  y de IL-6. El grupo de trasplante expresa intensamente el mRNA TNF $\alpha$ , y en menor medida el de IL-6 y HSP 70.

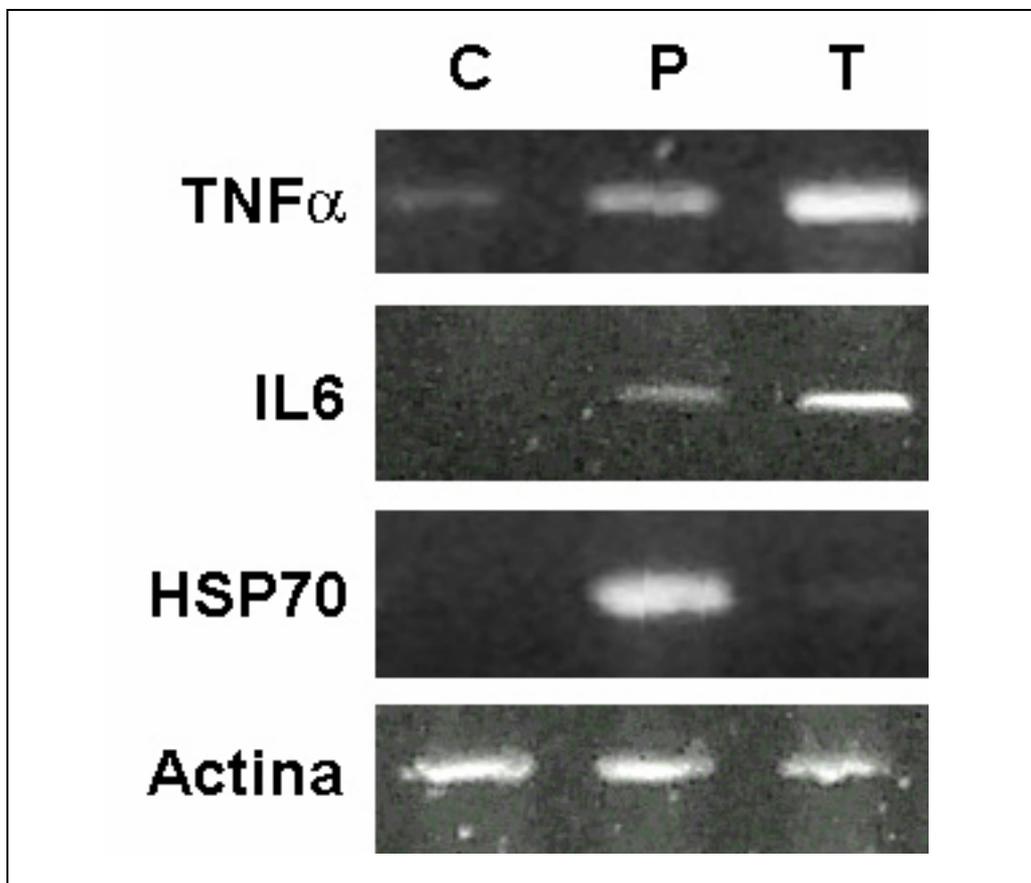


Figura 51. Expresión hepática del mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP70 con respecto a la proteína control (actina), en los grupos control (C), pancreatitis (P) y trasplante (T).

### 5.1.6 Estudio histológico

En la figura 52 se presentan las tinciones con hematoxilina-eosina de la glándula pancreática del grupo control (C), de aspecto normal y mostrando solo un moderado edema septal; de la glándula sometida a la administración de taurocolato sódico (P), con edema septal importante, infiltración por neutrófilos y una necrosis acinar severa; y de un injerto pancreático tras el trasplante (T) presentando un discreto edema

intersticial, con vacuolización de células acinares, áreas focales de necrosis y de hemorragia e importante acúmulo de neutrófilos.

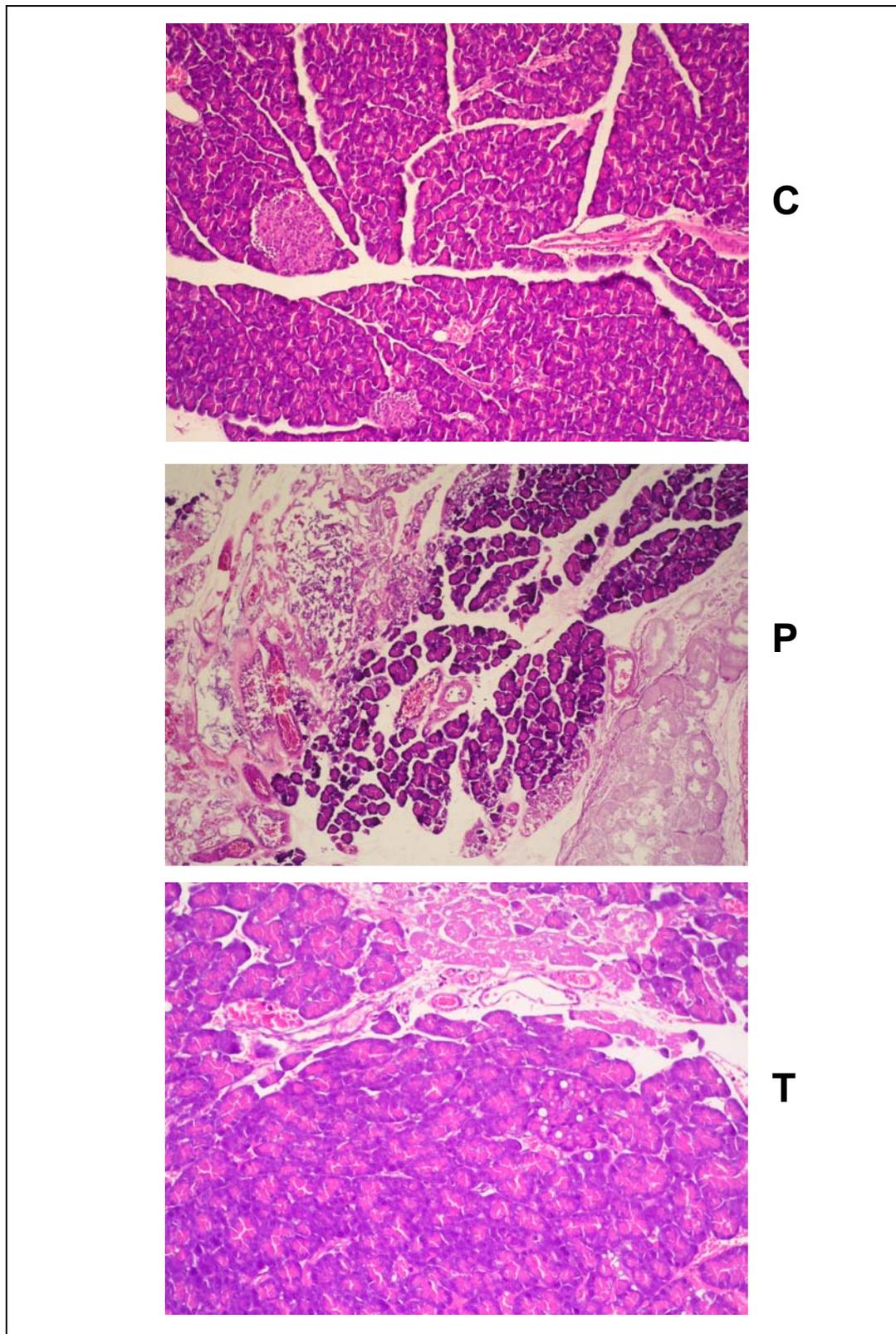


Figura 52. Histología pancreática en los grupos control, pancreatitis y trasplante.

La figura 53 muestra las preparaciones pulmonares teñidas con hematoxilina-eosina.

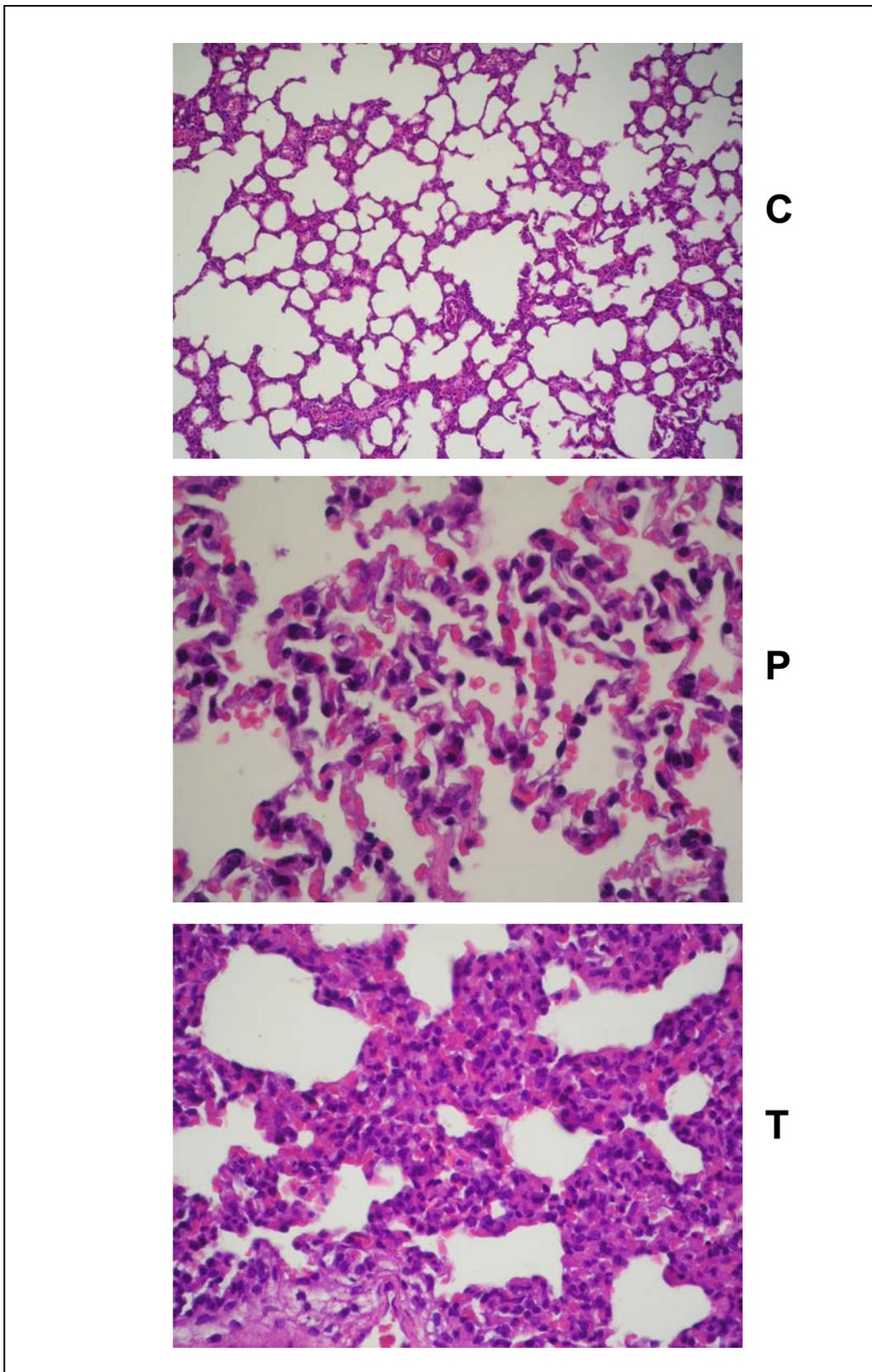


Figura 53. Histología pulmonar en los grupos control, pancreatitis y trasplante.

El grupo control (C) presenta histología normal y el grupo pancreatitis (P) muestra infiltración alveolar por neutrófilos y hematíes, así como un engrosamiento de las paredes alveolares. Los pulmones del grupo de trasplante (T) presentan un importante engrosamiento septal alveolar, con colapso de espacios alveolares y hemorragia, con una infiltración celular semejante a la del grupo de pancreatitis. El estudio histológico pancreático y pulmonar de los grupos con simulación de trasplante fue indistinguible del grupo control.

## ***5.2 Estudio comparativo entre la respuesta sistémica a la inflamación pancreática en un modelo de pancreatitis aguda en páncreas nativo y la resultante tras la pancreatitis aguda de un injerto de trasplante pancreático.***

### **5.2.1 Niveles de lipasa plasmática**

La figura 54 ilustra los niveles de lipasa en sangre periférica obtenidos a las 3 horas del experimento en los grupos de pancreatitis (P) y de trasplante isogénico con pancreatitis en el injerto (TPI). Para ambos grupos, los valores expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media aparecen en la tabla 4. **No existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0'796$ ).**

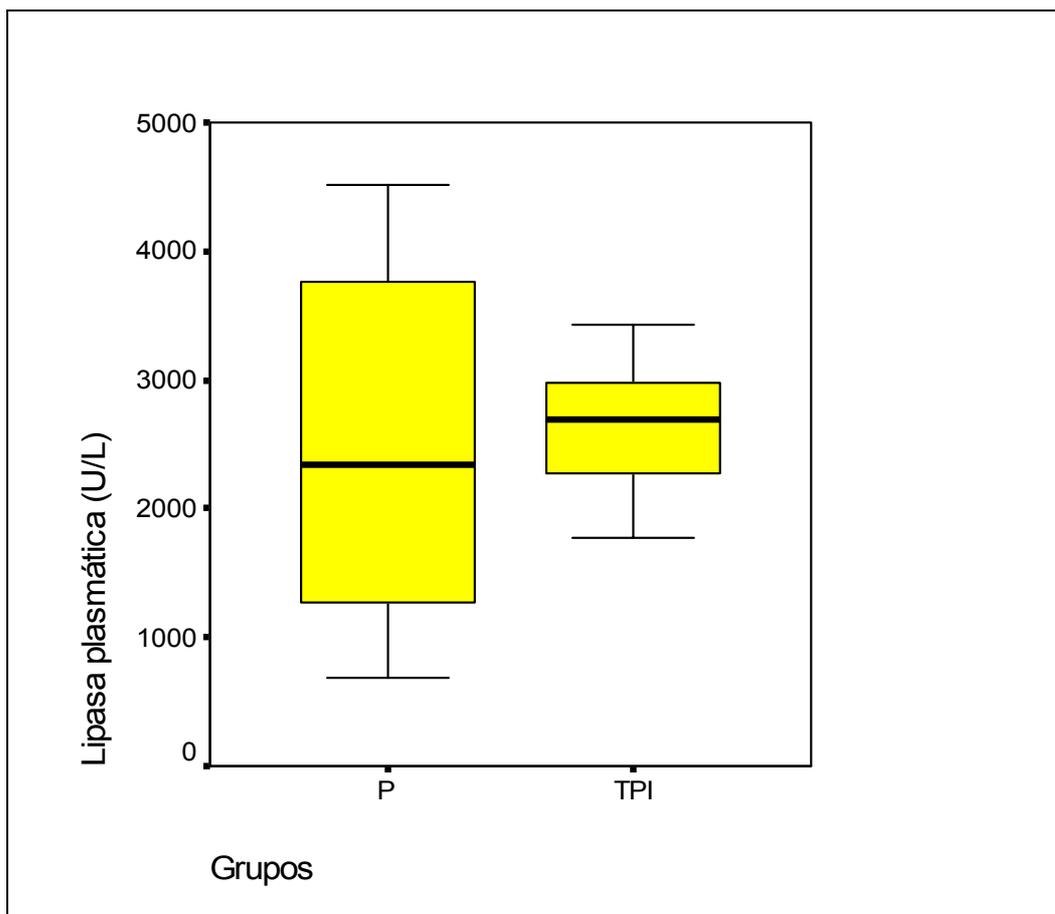


Figura 54. Valores de lipasa plasmática en U/L en los grupos pancreatitis (P) y trasplante con pancreatitis en el injerto (TPI).

## 5.2.2 Niveles de mieloperoxidasa pancreática

Los niveles de MPO pancreática para los grupos de pancreatitis y trasplante con pancreatitis en el injerto se muestran en la figura 55. **La MPO pancreática del injerto sometido a pancreatitis es muy superior a la que aparece en el grupo de la pancreatitis ( $p=0'004$ ).** La MPO en órgano nativo del trasplante sometido a pancreatitis del injerto no difiere del control ( $p=0'64$ ). Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se enumeran en la tabla 5.

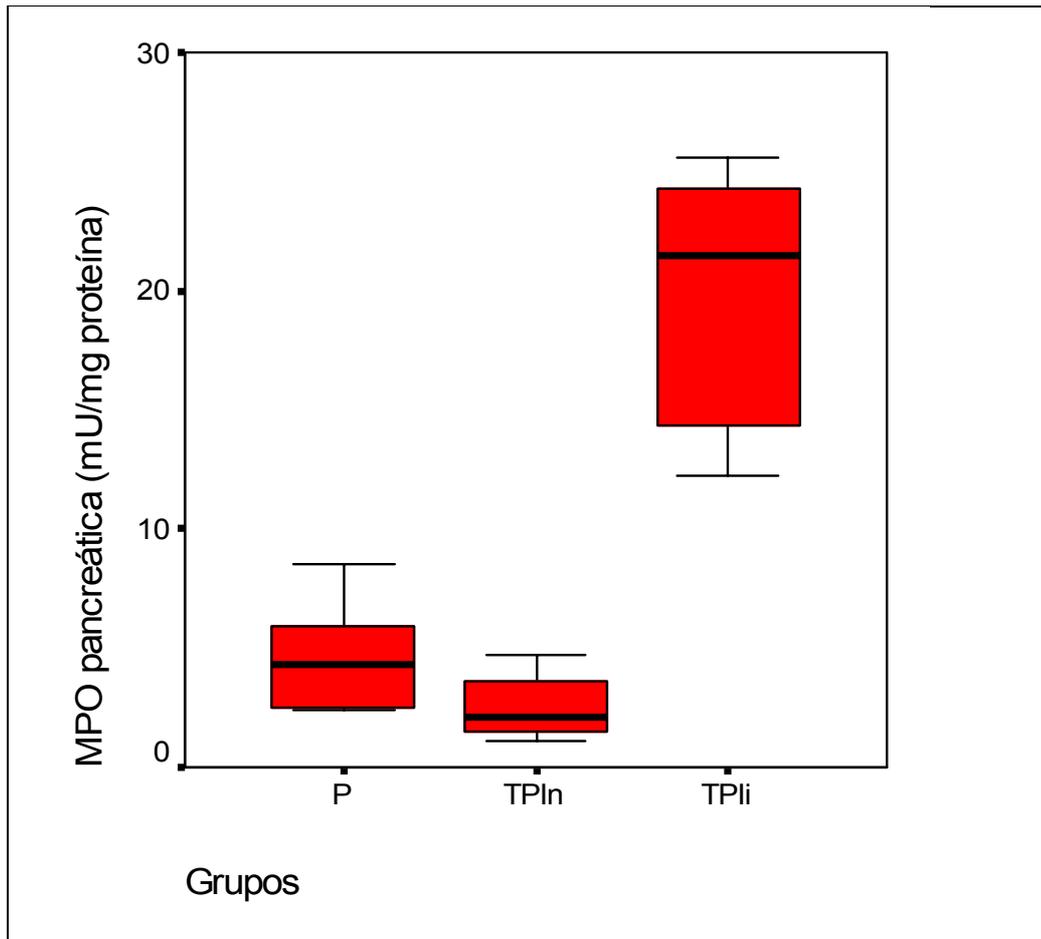


Figura 55. Niveles de MPO pancreática en el grupo de pancreatitis (P) y en el grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto, tanto en órgano nativo (TPIIn) como en el injerto (TPII).

### 5.2.3 Niveles de mieloperoxidasa pulmonar

La comparación de los niveles de MPO pulmonar entre los grupos de pancreatitis (P) y trasplante con pancreatitis en el injerto (TPI) se ilustra en la figura 56 mostrando una **elevación muy superior de esta enzima en el grupo de pancreatitis del injerto ( $p=0'007$ )**. Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se enumeran en la tabla 6.

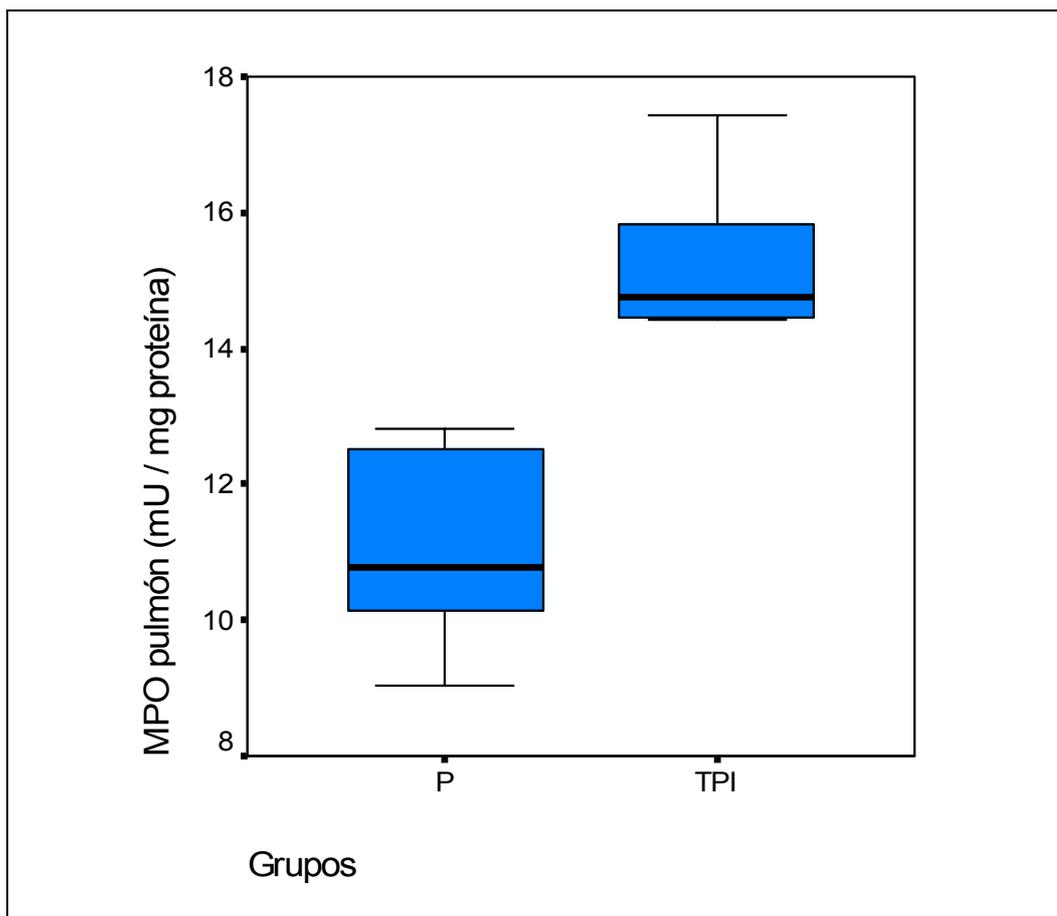


Figura 56. Valores de MPO pulmonar en los grupos pancreatitis (P), y trasplante con pancreatitis en el injerto (TPI).

#### 5.2.4 Niveles plasmáticos de receptores solubles 1 y 2 de $\text{TNF}\alpha$

La comparación de los niveles de  $\text{Rs}_1\text{-TNF}\alpha$  en sangre periférica determinados en los grupos P y TPI se muestran en la figura 57. **Los niveles de receptor son superiores en el grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto, con una  $p=0'078$ .** La tabla 9 muestra los valores medios de  $\text{Rs}_1\text{-TNF}\alpha$  en sangre periférica en los grupos a estudio.

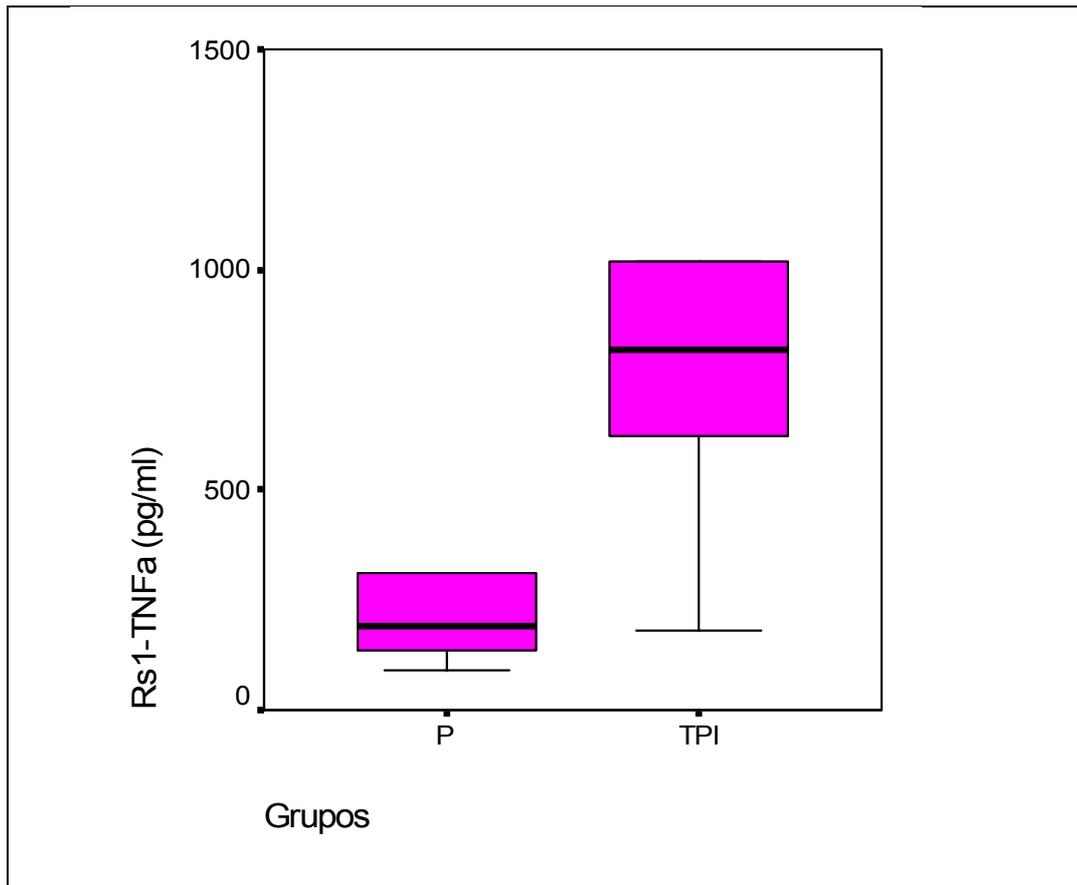


Figura 57. Niveles de  $Rs_1$ -TNF $\alpha$  en los grupos de pancreatitis (P) y trasplante con pancreatitis en el injerto (TPI).

Grupos	Media de $Rs_1$ -TNF $\alpha$ en pg/ml	Error estándar de la media
1 (C)	251	110
2 (P)	446	265
5 (T)	212	56
6 (TPN)	1435	402
7 (TPI)	876	224

Tabla 9. Medias de valores plasmáticos de  $Rs_1$ -TNF $\alpha$   $\pm$  error estándar de la media a nivel de sangre periférica (vena cava inferior) en pg/ml para los grupos control (C), pancreatitis (P), trasplante (T) y trasplante con pancreatitis en órgano nativo (TPN) o injerto (TPI).

Los niveles plasmáticos de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$  a nivel de cava inferior en los grupos P y TPI se muestran en la figura 58. Los valores en forma de

media  $\pm$  error estándar de la media se muestran en la tabla 10. **Los niveles séricos de Rs<sub>2</sub>-TNF $\alpha$  son superiores de forma significativa en el grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto al compararlos con el grupo de pancreatitis ( $p=0'006$ ).**

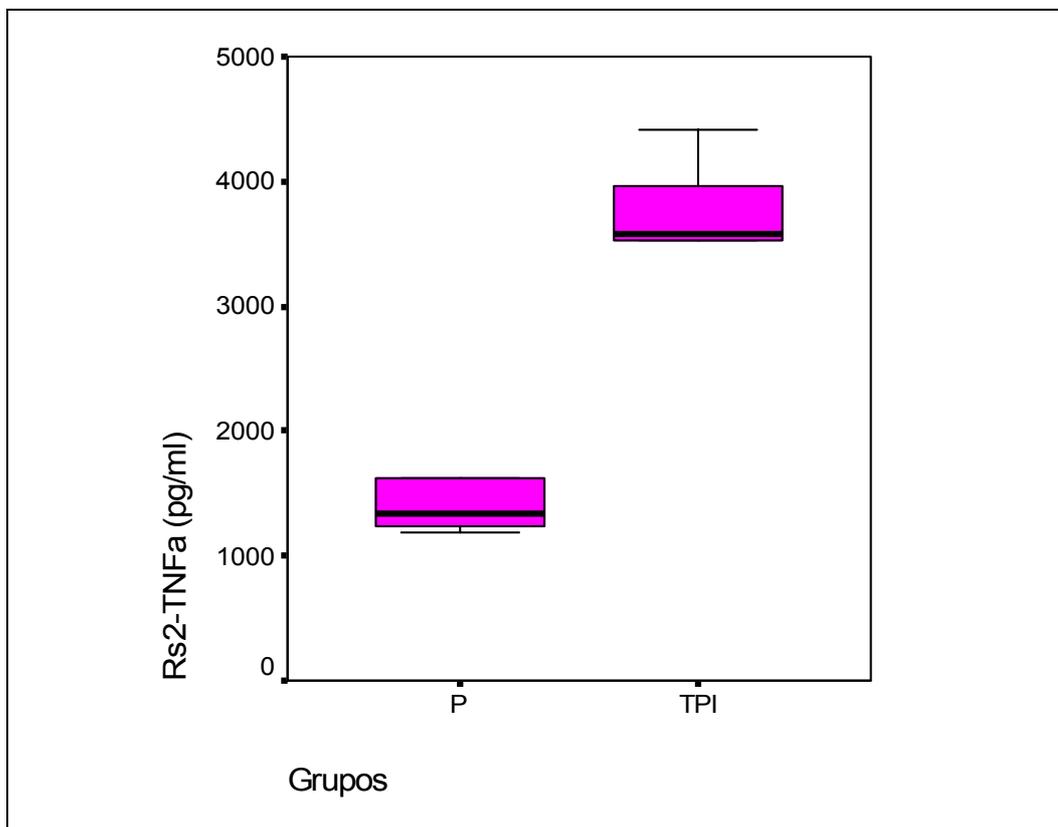


Figura 58. Niveles de Rs<sub>2</sub>-TNF $\alpha$  en los grupos de pancreatitis (P) y trasplante con pancreatitis en el injerto (TPI).

Grupos	Media de Rs <sub>2</sub> -TNF $\alpha$ en pg/ml	Error estándar de la media
1 (C)	1155	60
2 (P)	1618	279
5 (T)	2570	300
6 (TPN)	4808	313
7 (TPI)	3606	246

Tabla 10. Valores plasmáticos medios de Rs<sub>2</sub>-TNF $\alpha$   $\pm$  error estándar de la media en pg/ml en sangre periférica para los grupos control, pancreatitis, trasplante, trasplante con pancreatitis en el órgano nativo y trasplante con pancreatitis en el injerto.

### 5.2.5 Niveles de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70.

La figura 59 muestra la expresión hepática del mRNA del TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP 70 en los grupos P y TPI determinados por RT-PCR. El grupo de pancreatitis expresa de un modo intenso el mRNA de la HSP 70, y en menor medida el de TNF $\alpha$  y de IL-6. El grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto expresa intensamente el mRNA de IL-6, con menor intensidad el de TNF $\alpha$  y no expresa el de HSP 70.

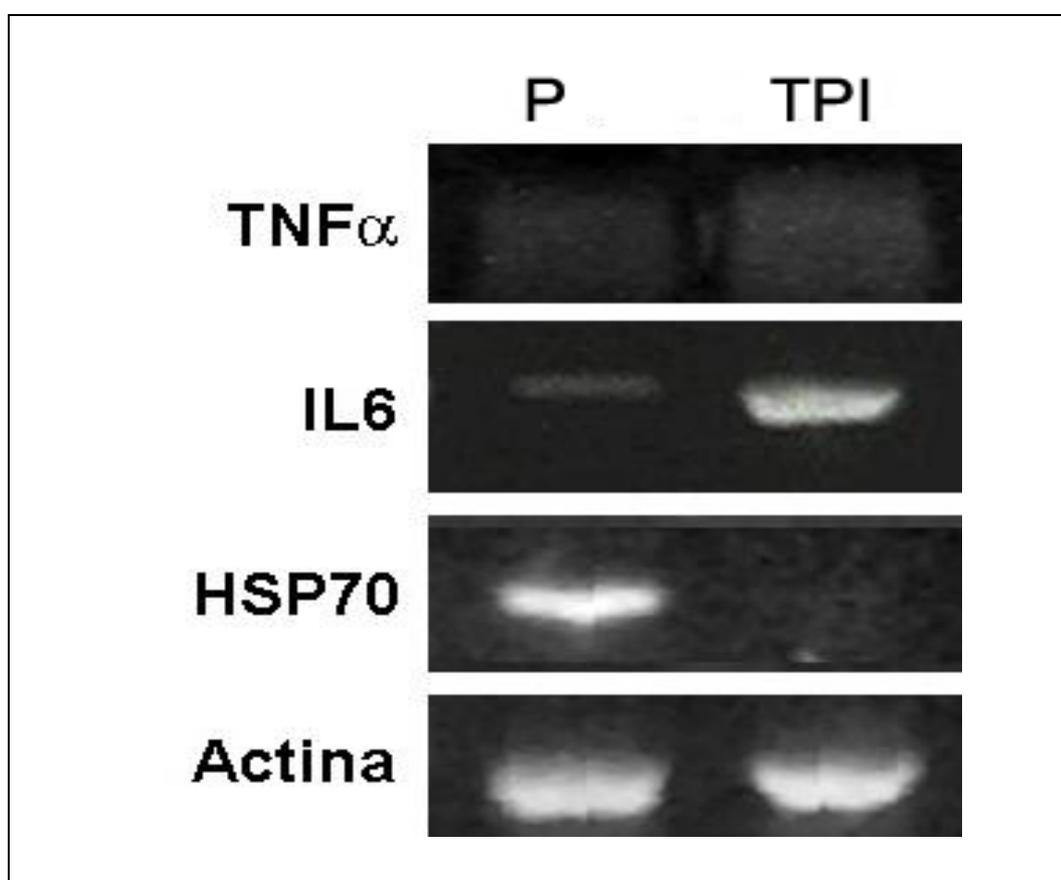


Figura 59. Expresión hepática del mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP70 con respecto a la proteína control (actina), en los grupos pancreatitis (P) y trasplante con pancreatitis en el injerto (TPI).

### 5.2.6 Estudio histológico.

La tinción histológica con hematoxilina-eosina del injerto pancreático tras la inyección de taurocolato sódico se muestra en la figura

60. En ella se aprecian la infiltración por neutrófilos y una necrosis acinar severa, así como hemorragia y vacuolización.

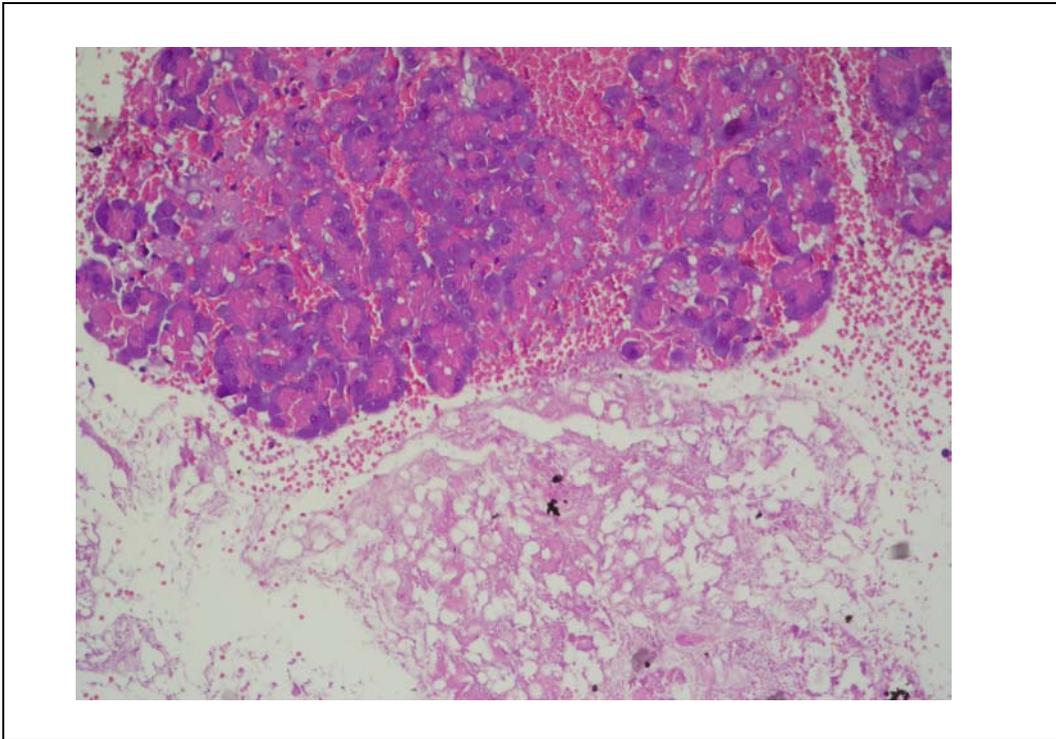


Figura 60. Histología del injerto pancreático tras administración intraductal de taurocolato sódico.

En la figura 61 se muestra la histología pulmonar de este grupo de estudio (TPI), presentando un importante engrosamiento septal alveolar, con colapso de espacios alveolares y hemorragia, con una infiltración de células polimorfonucleares superior a la del grupo de pancreatitis pero no distinguible de la que aparece en el grupo de trasplante sin pancreatitis (figura 53 P y T).

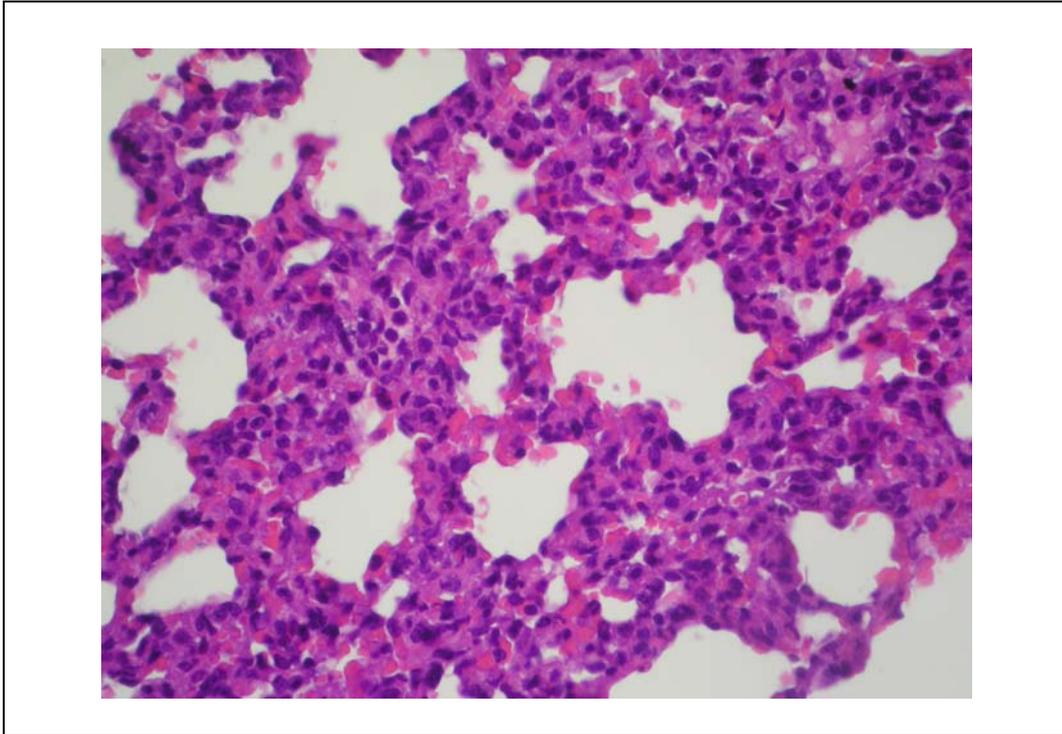


Figura 61. Histología pulmonar tras la administración de taurocolato sódico sobre el injerto pancreático.

***5.3 Estudio de la modificación de la respuesta sistémica a la pancreatitis en presencia de tejido pancreático viable. Comparación entre la lesión provocada tras la realización de un trasplante y la administración intraductal de taurocolato sódico en el órgano nativo y sobre el injerto pancreático.***

**5.3.1 Niveles de lipasa plasmática**

La figura 62 ilustra los niveles de lipasa en sangre periférica obtenidos a las 3 horas del experimento en los grupos de trasplante

isogénico con pancreatitis en el órgano nativo (TPN) y de trasplante isogénico con pancreatitis en el injerto (TPI). Para ambos grupos, los valores expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media aparecen en la tabla 4. **No existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0'175$ ).**

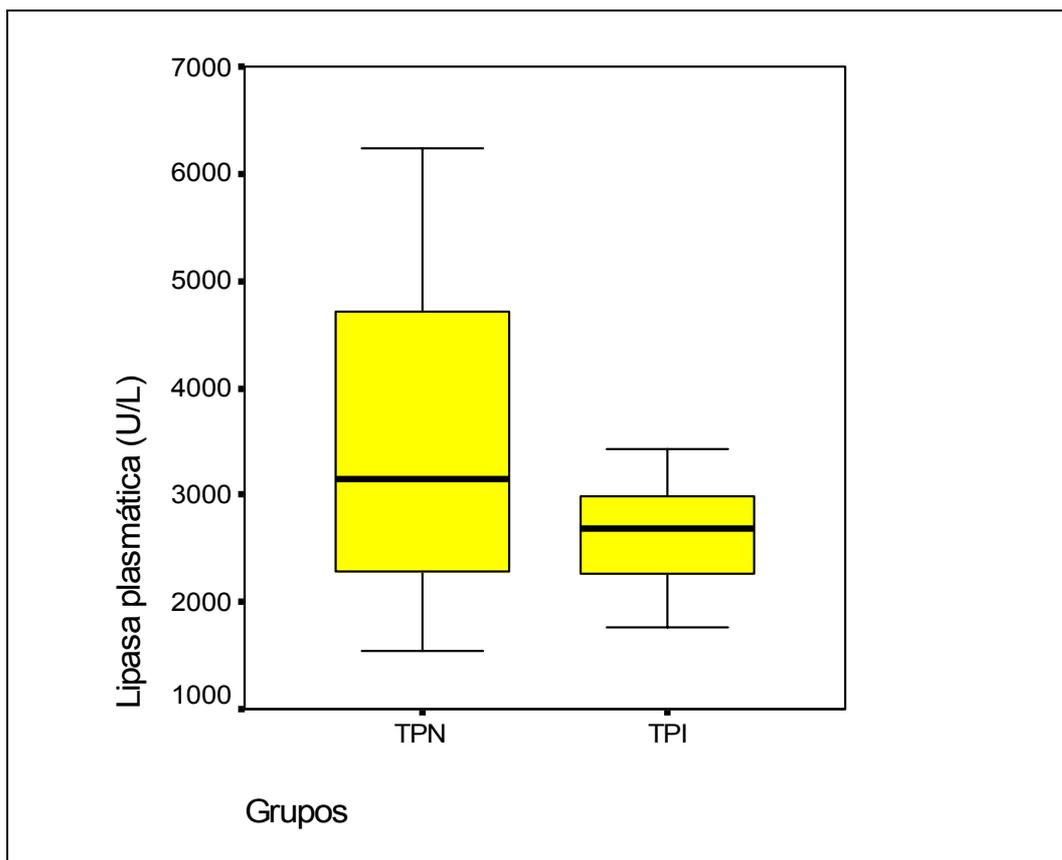


Figura 62. Niveles de lipasa plasmática en los grupos de trasplante, con pancreatitis en el injerto y en el nativo.

### 5.3.2 Niveles de mieloperoxidasa pancreática

Los niveles de MPO pancreática para los grupos de trasplante con pancreatitis en el órgano nativo y en el injerto se muestran en la figura 63. **La MPO pancreática del injerto sometido a pancreatitis no difiere de la del injerto sin ella ( $p= 0'180$ ).** El páncreas nativo del trasplante con pancreatitis en el injerto presenta valores de MPO normales ( $p=0'64$  con respecto al grupo control), y el páncreas nativo sometido a pancreatitis

eleva la MPO al rango de una pancreatitis sin trasplante asociado ( $p=0'737$ ). Como es esperable existen diferencias entre ambos páncreas nativos ( $p=0'015$ ). Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se enumeran en la tabla 5.

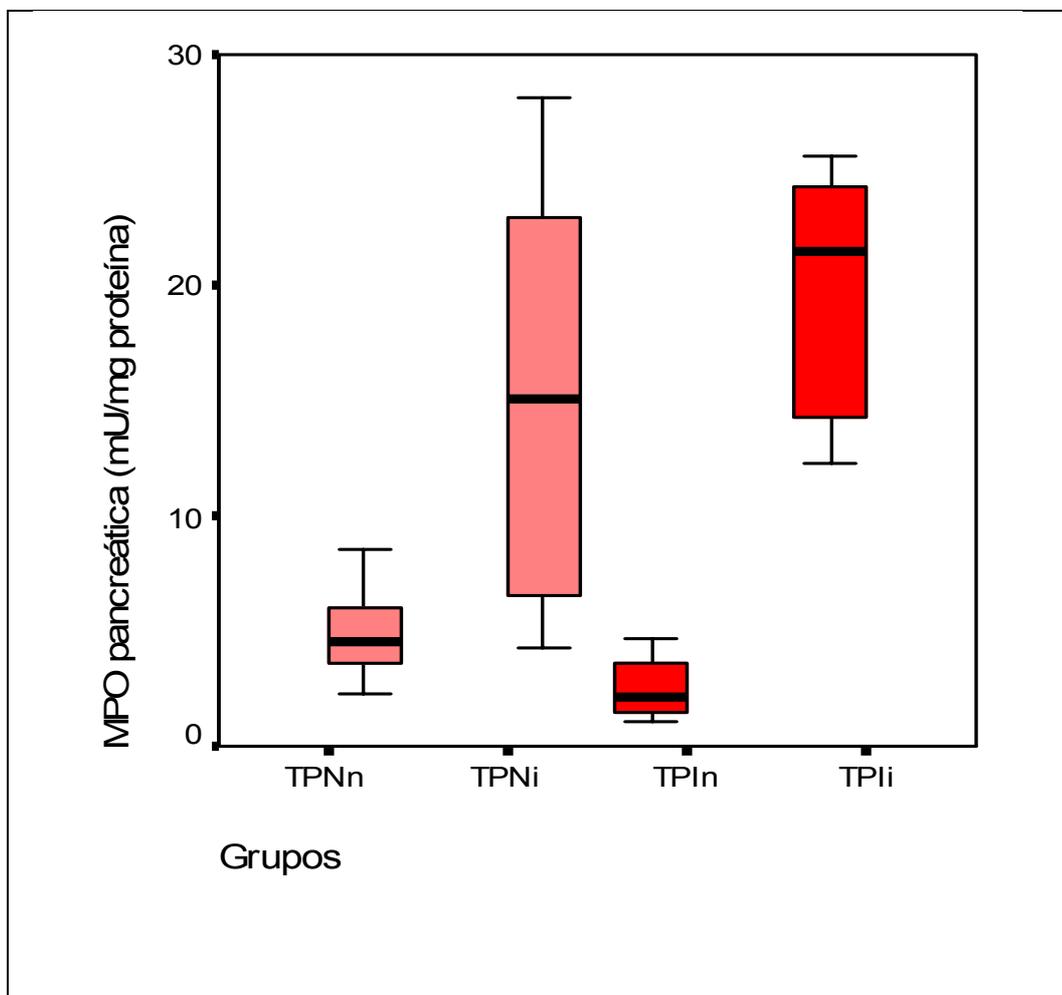


Figura 63. Mieloperoxidasa pancreática en los grupos de trasplante asociado a pancreatitis, TPN y TPI. (n: nativo; i: injerto).

### 5.3.3 Niveles de mieloperoxidasa pulmonar

La comparación de los niveles de MPO pulmonar entre los grupos de trasplante con pancreatitis en órgano nativo (TPN) y en el injerto (TPI) se ilustra en la figura 64 mostrando que en ambos se encuentra muy elevada y no hay diferencias significativas entre ellos ( $p=0'205$ ). Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se enumeran en

la tabla 6. En ambos grupos los niveles no difieren de los aparecidos en el grupo de trasplante (T vs. TPN  $p= 0'653$ ; T vs. TPI  $p=0'083$ ).

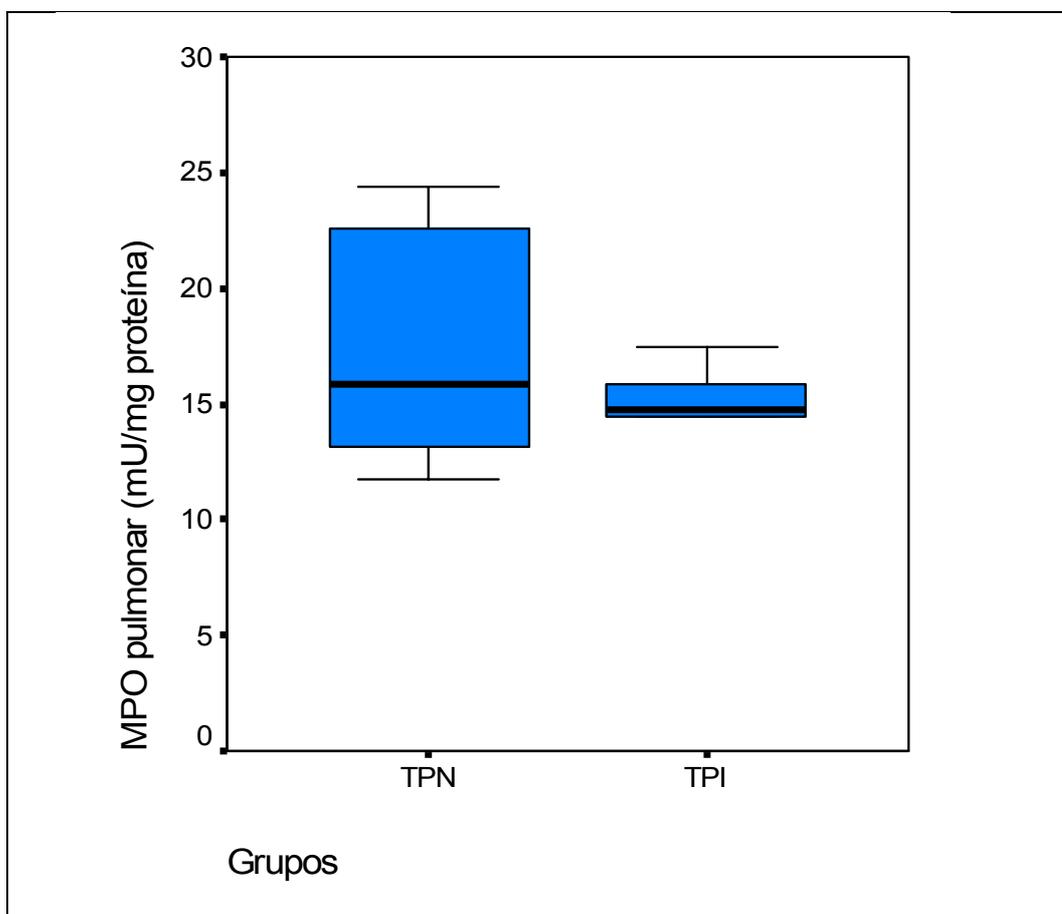


Figura 64. Niveles de MPO pulmonar en los grupos de trasplante con pancreatitis en el órgano nativo (TPN) y en el injerto (TPI).

### 5.3.4 Niveles plasmáticos de receptores solubles 1 y 2 de $TNF\alpha$

La comparación de los niveles plasmáticos de  $Rs_1-TNF\alpha$  en sangre periférica determinados en los grupos TPN y TPI se muestran en la figura 65. **No existen diferencias entre ambos grupos ( $p= 0'252$ ), si bien en ambos existe una elevación del receptor en comparación con el grupo de trasplante (T vs. TPN  $p= 0'13$ ; T vs. TPI  $p= 0'03$ ).** La tabla 9 muestra los valores medios de  $Rs_1-TNF\alpha$  en los grupos a estudio.

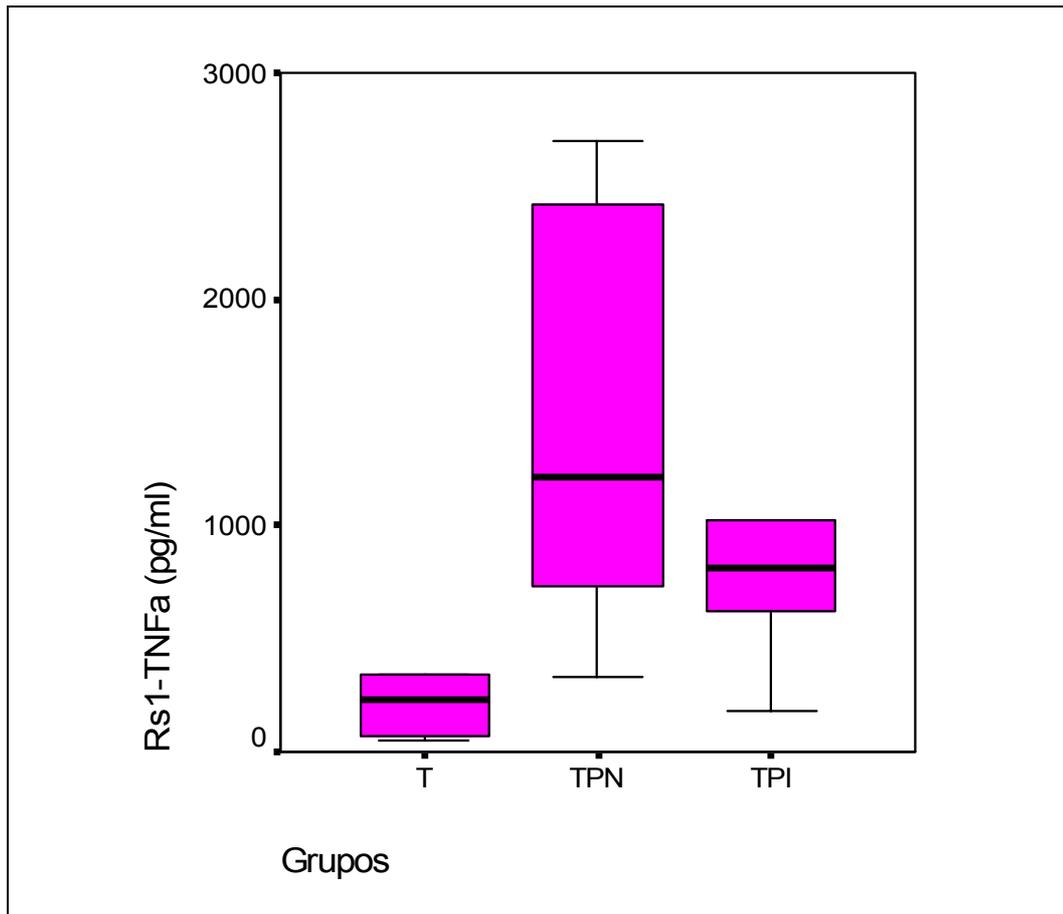


Figura 65. Niveles de  $Rs_1$ -TNF $\alpha$  en los grupos de trasplante.

Los niveles plasmáticos de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$  a nivel de circulación periférica en los grupos TPN y TPI se muestran en la figura 66. Los valores en forma de media  $\pm$  error estándar de la media se muestran en la tabla 10. **Los niveles séricos de  $Rs_2$ -TNF $\alpha$  son superiores de forma significativa en el grupo de trasplante con pancreatitis en el nativo al compararlos con el grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto ( $p=0'013$ ).**

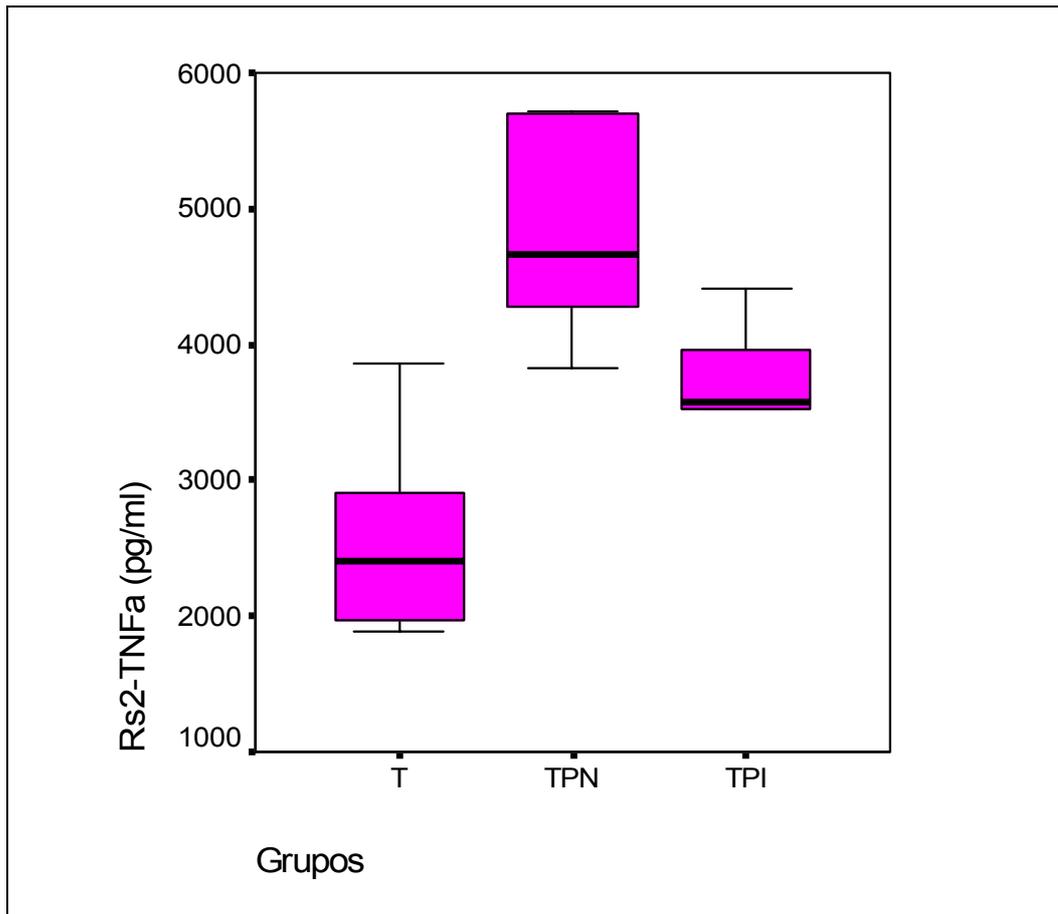


Figura 66. Niveles de Rs<sub>2</sub>-TNFα en los grupos de trasplante.

### 5.3.5 Niveles de mRNA de TNFα, IL-6 y HSP 70.

La figura 67 muestra la expresión hepática del mRNA del TNFα, IL-6 y HSP 70 en los grupos TPN y TPI determinados por RT-PCR. El grupo de trasplante con pancreatitis en el órgano nativo expresa intensamente el mRNA de IL-6 y TNFα, y en menor medida la HSP 70. El grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto expresa intensamente el mRNA de IL-6, mínimamente el de TNFα y no expresa el de HSP 70.

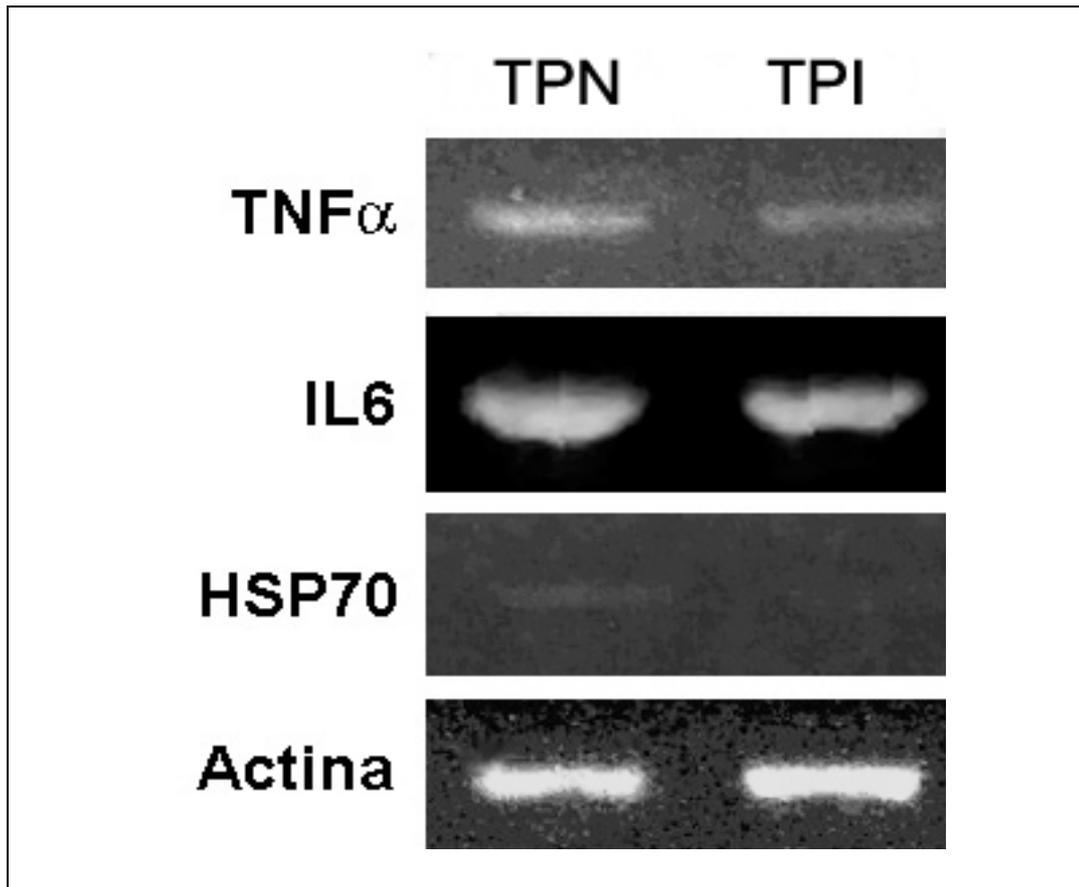


Figura 67. Expresi6n hep6tica del mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y HSP70 con respecto a la prote6na control (actina), en los grupos de trasplante con pancreatitis en 6rgano nativo (TPN) y en el injerto (TPI).

### 5.3.6 Estudio histol6gico.

Como se aprecia en las fotograf6as de las figuras 52 y 60, en que se presenta un injerto pancre6tico tras la realizaci6n del trasplante, y un injerto tras administraci6n de taurocolato s6dico, existe un mayor componente de necrosis glandular en el injerto sometido a inyecci6n por taurocolato. Las histolog6as pulmonares de ambos grupos no presentan diferencias (figura 68), mostrando un importante engrosamiento septal alveolar, con colapso de espacios alveolares y hemorragia, con una gran infiltraci6n celular.

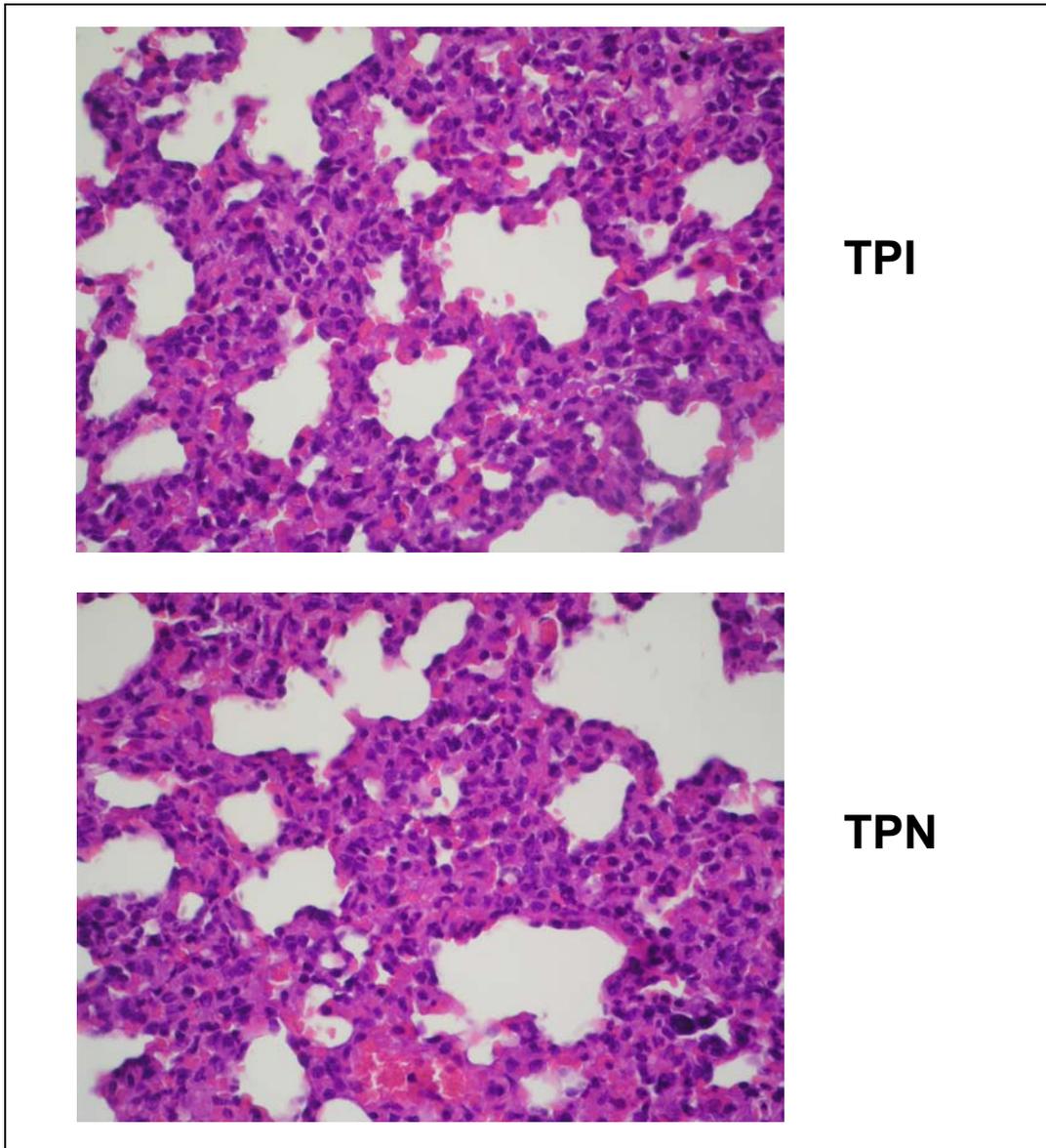


Figura 68. Tinciones con hematoxilina-eosina de los pulmones en los grupos de trasplante con pancreatitis en el órgano nativo (TPN) y en el injerto (TPI).

---

## 6 Discusión

Los tres modelos experimentales más empleados para la evaluación del papel de los mediadores proinflamatorios en la pancreatitis aguda son el de hiperestimulación con ceruleína, la infusión de sales biliares y la inducida por dieta deficiente en colina y suplementada con etionina. De entre ellos, el modelo experimental de pancreatitis por administración de taurocolato sódico es el que más se asemeja a la pancreatitis biliar humana, presentando unas alteraciones mecánicas y morfológicas, tanto a nivel pancreático como pulmonar, muy similares a las apreciadas en la clínica<sup>74</sup>. Este modelo reproduce además las formas más severas de la enfermedad y se ha sugerido como el más idóneo para evaluar las complicaciones locales y sistémicas de la pancreatitis aguda y su posible tratamiento<sup>123</sup>.

La secuencia de acontecimientos que tiene lugar en las primeras fases de la pancreatitis aguda experimental por taurocolato sódico se debe al efecto detergente del ácido taurocólico, producto de la disociación de esta sal biliar, sobre las membranas celulares. Esto provoca la

activación de enzimas proteolíticas mediante el incremento de la concentración citoplasmática de calcio (proteasas calcio dependientes) y por facilitar la fusión de los lisosomas con los gránulos de zimógeno (produciéndose la activación del tripsinógeno contenido en éstos). La activación de la tripsina desencadena una cascada enzimática que incluye procesos de hidrólisis y proteólisis, y también provoca la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. Además, la muerte celular conlleva la degradación de nucleótidos, generándose grandes cantidades de hipoxantina y xantina, sustrato para la producción de ácido úrico y radicales libres por parte de la XOD. Estos RLO actúan localmente sobre células vecinas potenciando el alcance de la lesión y también presentan actividad plasmática, y por tanto estrés oxidativo a nivel sistémico. En este sentido, la participación de la XOD pancreática como inductora de lesión pulmonar, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos, ha sido ampliamente estudiada<sup>62</sup>. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el aumento de la actividad XOD plasmática no es capaz, por sí solo, de inducir un proceso inflamatorio en pulmón<sup>157</sup>. Ello implica la existencia de otros factores en la génesis de la respuesta sistémica a la pancreatitis aguda.

Por otro lado, a diferencia de otros modelos de pancreatitis aguda experimental, el modelo de taurocolato sódico permite graduar la severidad y la mortalidad de la pancreatitis según la concentración y el volumen de la solución de sal biliar administrada. Con una concentración del 3 al 3'5% la mortalidad es del 25% en las primeras 72 horas. En nuestro caso, siendo la concentración del 5%, la mortalidad es del 100%

---

en las primeras 24 horas<sup>339</sup>. Por tanto, este es un modelo que tiende a producir una pancreatitis grave en la que la mortalidad se debe no solo a efectos locales, sino sobre todo a los efectos sistémicos precoces que provoca. Además, el escaso volumen de taurocolato sódico necesario para inducir la pancreatitis y la homogeneidad de los resultados obtenidos por los diferentes investigadores lo hacen un modelo ideal para el estudio de los efectos que la pancreatitis aguda experimental produce sobre los órganos a distancia.

El papel desarrollado por el hígado en la respuesta sistémica a la pancreatitis aguda experimental ha sido objeto de numerosas investigaciones. De los estudios realizados hasta la fecha se desprende la conclusión de que el hígado, si bien participa de forma activa en la génesis de la respuesta inflamatoria, no es un órgano diana de esta reacción<sup>115,267</sup>. La producción de mediadores de origen hepático derivados de los macrófagos tisulares (células de Kupffer) causa lesiones a nivel pulmonar. La prevención de la producción de estos mediadores mediante la pacificación de los macrófagos atenúa la lesión, pero no la elimina completamente. Ello sugiere que existen otros mecanismos lesivos, como los inducidos por la ascitis pancreática<sup>85,112</sup>. Sin embargo, la absorción transperitoneal de mediadores del líquido ascítico no es suficiente para justificar la lesión sistémica asociada a la pancreatitis. El mecanismo de la lesión a distancia en la pancreatitis aguda es aún objeto de controversia. Se ha establecido experimentalmente una secuencia temporal y una afectación selectiva de determinados órganos<sup>52</sup>. Nuestro grupo ha aportado evidencias a favor de la participación del hígado en la

potenciación de la cascada inflamatoria en la pancreatitis aguda experimental en estudios sobre el drenaje venoso portal del páncreas. Empleando el modelo de pancreatitis inducida por taurocolato sódico y a partir de la realización de un shunt porto-cava previo a la pancreatitis, se originan cambios en la respuesta sistémica a nivel pulmonar<sup>255</sup>. El modelo de shunt porto-cava implica que los mediadores inflamatorios generados por la pancreatitis podrían ser específicos para determinadas células hepáticas, o bien que la cantidad de los citados mediadores no fuera suficiente para inducir estímulo sistémico, ya que su llegada directa al pulmón a través del shunt no estimula la inflamación pulmonar.

El segundo modelo de inflamación pancreática empleado en nuestro estudio es el producido por la isquemia-reperfusión de un isoinjerto duodeno-pancreático con anastomosis porto-sistémica y duodeno-yeyunal, según la técnica descrita por Lee en 1971<sup>314</sup>. La utilización de este modelo responde a diversos motivos. En primer lugar éste es el modelo de trasplante que obtiene los mejores resultados en cuanto a supervivencia de animales e injertos, así como un correcto funcionalismo glandular endocrino y exocrino<sup>315</sup>. Además, con la utilización de isoinjertos eliminamos el problema del rechazo inmunológico. Así mismo, este modelo ofrece la posibilidad teórica de estudiar los efectos sistémicos de la inflamación pancreática en un contexto que evita la circulación hepática directa de mediadores. Sin embargo, el principal inconveniente de este modelo es la elevada mortalidad, principalmente debida a trombosis vascular, pancreatitis del injerto y hemorragia<sup>316</sup>. En nuestro caso, la curva de aprendizaje del

modelo fue larga, realizándose 15 experimentos para perfeccionar la cirugía del animal donante y hasta 20 experimentos más hasta la consecución de trasplantes con supervivencia superior a 24 horas. La elevada mortalidad inicial de estos casos se atribuyó a la hemorragia perioperatoria con shock hipovolémico asociado a un tiempo operatorio prolongado (superior a 45 minutos). Otros problemas técnicos objetivados durante la fase de aprendizaje fueron la hipertensión portal del injerto por estenosis de la anastomosis porto-cava y la trombosis a nivel de dicha anastomosis. La realización precisa de las anastomosis vasculares fue esencial para superar esta fase. Un procedimiento de trasplante se consideró satisfactorio cuando la permeabilidad de las anastomosis vasculares y el color del injerto eran adecuados previamente a la extracción de las muestras.

Durante la fase de isquemia, la falta de oxígeno conduce al metabolismo anaeróbico, con un rendimiento energético inferior y un incremento de otros metabolitos, como la hipoxantina o el ácido láctico. La acidosis resultante altera la cinética normal de las enzimas y la célula se ve privada de la energía necesaria para mantener la homeostasis. La depleción de ATP produce una alteración de las bombas sodio/potasio y calcio, perdiéndose el gradiente a través de las membranas celulares. Estos fenómenos provocan una alteración de las organelas citoplasmáticas y de la integridad de la membrana, que puede desencadenar la activación de proteasas y la muerte celular<sup>280</sup>. En la fase de reperfusión, al restablecerse el flujo sanguíneo se producen diferentes

mediadores que inducen una respuesta inflamatoria inmediata, con la consiguiente alteración de la microcirculación y lesión tisular.

Los mediadores más importantes de la lesión por I/R son los RLO, y la fuente más importante de producción de radicales libres en el tejido postisquémico es el sistema de la xantinaoxidasa. Hoy en día se conoce que existe una relación entre el  $O_2^-$  generado a partir de la xantinaoxidasa y la activación de los neutrófilos<sup>340</sup>. Una posible limitación del modelo en nuestro estudio es la utilización de la solución de preservación de Wisconsin durante la fase de isquemia fría del páncreas donante. Esta solución posee alopurinol, un conocido inhibidor de la xantinaoxidasa<sup>152</sup> que previene la expresión de P-selectina en la célula endotelial, inhibiendo el reclutamiento de neutrófilos. Sin embargo, un estudio realizado por Wahlberg para investigar la pancreatitis causada por la lesión de isquemia fría sobre el injerto pancreático, empleando un modelo canino de perfusión aislada, normotérmica “ex vivo”, mostró que la administración de alopurinol junto con el líquido de perfusión no prevenía los signos de pancreatitis<sup>341</sup>. Además, en el síndrome de I/R existen otras fuentes de RLO, como la NADPH oxidasa asociada a la membrana plasmática de los neutrófilos. Una cuestión no resuelta de la relación entre los neutrófilos y la lesión por I/R es el mecanismo que estimula o induce la continuidad de la lesión.

La hipotermia disminuye el índice metabólico. Las reacciones bioquímicas y el grado de degradación de componentes celulares necesarios para la viabilidad de los órganos se reducen. Sin embargo, en estas condiciones aún se producen algunos eventos que llevan a la

activación de mediadores inflamatorios que durante la reperfusión provocarán efectos nocivos para el órgano preservado.

La lesión celular del endotelio vascular se hace patente tras la reperfusión del tejido isquémico. Muchos investigadores implican a los leucocitos polimorfonucleares como mediadores de la lesión microvascular. A la vista de nuestros resultados es evidente que los neutrófilos se infiltran en el tejido isquémico y esto se asocia con la adherencia y extravasación de estas células. La adherencia de los neutrófilos durante el estado de hipoperfusión crea un círculo cerrado que se caracteriza por una más amplia adherencia leucocitaria con el lógico incremento de la resistencia microvascular y la disminución del flujo sanguíneo. Ello aumenta la producción de RLO y liberación de enzimas citotóxicos. Existe una correlación entre la lesión de I/R y los leucocitos PMN, que se establece a partir de la presencia de factores quimiotácticos superóxido dependientes, con la consiguiente activación de estas células, que aportarían una segunda fuente de radicales e incrementarían a la lesión inicial.

Al considerar el modelo de trasplante isogénico heterotópico pancreático como inductor de respuesta sistémica, debe tenerse en cuenta el posible impacto de la obtención del órgano en la futura lesión por I/R. En un estudio reciente, empleando nuestra misma cepa de animales y el mismo modelo de obtención de órganos, Drognitz examina el impacto de la técnica estandarizada de obtención del injerto pancreático en la microcirculación y la apoptosis. Para ello diseña tres grupos de estudio, un grupo control sin disección pancreática, un segundo

grupo que disecciona la glándula hasta dejarla únicamente pediculada por los vasos, y un tercero en que realiza el trasplante completo. Sus resultados concluyen que no existen diferencias entre el control y la disección casi total, mientras que ambos grupos difieren significativamente del grupo de trasplante. Es decir, que la técnica de obtención del órgano no influye negativamente en la densidad capilar funcional y el índice apoptótico del injerto duodeno-pancreático<sup>342</sup>.

Otro aspecto importante es la posible interferencia en los resultados por la interrupción del flujo sanguíneo arterial y venoso a las extremidades inferiores durante la realización del implante. Para conocerla, nuestro estudio fue diseñado con la inclusión de dos grupos control con simulación de trasplante (ST y STP), uno de ellos con pancreatitis aguda asociada. De nuestros resultados se desprende la conclusión de que una obstrucción vascular de 40 minutos, necesaria para realizar el implante, no modifica la respuesta inflamatoria sistémica a nivel pulmonar (figura 48).

En nuestro estudio, el cálculo del tamaño muestral se ha basado en la comparación de los niveles de lipasa plasmática entre los diferentes grupos. La lipasa es una enzima digestiva secretada por el páncreas que hidroliza los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. En el caso de una pancreatitis aguda, esta enzima se encuentra en elevadas concentraciones en plasma, lo que permite utilizarla como un marcador de lesión pancreática. Ensayos precedentes realizados por nuestro grupo sugieren una variación a escala logarítmica de esta variable, siendo por tanto necesaria una estimación de las medias geométricas y desviación

estándar<sup>84,255</sup>. La muestra mínima necesaria, bajo las asunciones de distribución normal e igualdad de varianzas y con un error alfa global del 5% y una potencia del 90%, es de 8 ratas por grupo. Para las variables cuantitativas continuas, los resultados obtenidos se expresan en forma de media  $\pm$  error estándar de la media. Hemos empleado el error estándar de la media en lugar de la desviación estándar por ser una medida más precisa de la dispersión poblacional en el caso de las variables que no siguen una distribución normal. En el análisis estadístico descriptivo inicial de estas variables se realiza una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. En caso de hallarse distribuciones normales, la comparabilidad de estas se estima mediante la prueba de Levene para la igualdad de las varianzas y posteriormente con la T de Student determinándose el nivel de significación estadística con una  $p < 0.05$ . En caso de no presentar una distribución normal, las medias de las variables se comparan mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Además de la lipasa plasmática, nuestro estudio comparativo incluye las determinaciones plasmáticas y tisulares de diferentes enzimas y moléculas mediadoras del proceso inflamatorio. Entre ellas la mieloperoxidasa, que es un excelente marcador de inflamación e infiltración polimorfonuclear debido a su abundancia en los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares<sup>343</sup>. Diversos autores han empleado con anterioridad su determinación por el método de la tetrametilbenzidina para medir el grado de inflamación pancreática o pulmonar en diferentes modelos de pancreatitis aguda<sup>245,344</sup> o trasplante experimental<sup>297</sup>.

El nivel elevado de citoquinas en sangre periférica también se ha considerado indicador de inflamación aguda. Entre ellas, el TNF $\alpha$  es particularmente importante porque, además de ser una potente citoquina proinflamatoria, puede provocar la síntesis de numerosas citoquinas y otras moléculas de adhesión. La medición de los receptores solubles del TNF $\alpha$  se ha demostrado incluso más eficaz que la medición de la propia citoquina por la observación de que los pacientes con altas concentraciones de receptor soluble y TNF $\alpha$  libre indetectable pueden desarrollar complicaciones sistémicas en la pancreatitis aguda<sup>196</sup>. Sin embargo, no está claro si los receptores libres del TNF $\alpha$  actúan uniéndose e inactivando el TNF $\alpha$  circulante, o bien estabilizando la molécula y aumentando su vida media. Pese a todo, las últimas evidencias van más a favor de un papel proinflamatorio que de tampón.

Por otro lado, mediante el análisis de la expresión del TNF $\alpha$  mRNA a nivel hepático por técnicas de RT-PCR se ha podido establecer la participación del hígado en la respuesta sistémica a la pancreatitis como potenciador de dicha respuesta<sup>245</sup>. En nuestro estudio, además se han evaluado por esta técnica otros mediadores proinflamatorios y moléculas relacionadas con la respuesta a la agresión, como la IL-6, citoquina mediadora de la síntesis de proteínas de fase aguda y factor crítico antilesional, antifibrótico y proregenerativo en el hígado<sup>224</sup>, o la HSP 70. Un aspecto novedoso de nuestro trabajo es la aplicación de estas técnicas para el estudio del papel del hígado en la respuesta sistémica al trasplante.

Un último detalle a considerar sobre la metodología de nuestro estudio es el tiempo transcurrido desde el estímulo inflamatorio hasta la toma de las muestras. Se escogió un lapso de 3 horas por ser el tiempo necesario para objetivar las manifestaciones sistémicas a nivel pulmonar tras la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato sódico en otros estudios realizados por nuestro grupo<sup>334</sup>.

En la primera parte de nuestro estudio se analizan las diferencias, tanto a nivel local como sistémico, entre el modelo de pancreatitis aguda por administración de taurocolato sódico y la realización de un trasplante isogénico heterotópico de injerto duodeno-pancreático. Como se aprecia en la figura 46, los niveles de lipasa plasmática son similares en el grupo control y en el grupo de trasplante, hallándose discretamente elevados con respecto al grupo de simulación de trasplante. Ello se podría explicar por la ausencia de manipulación glandular en este último grupo frente a los otros dos. La lipasa se halla significativamente más elevada en los grupos con pancreatitis. La discreta elevación de la lipasa plasmática en el grupo de trasplante aparecida en nuestro estudio contrasta con los resultados publicados en la literatura, en los que la realización de una I/R pancreática aumenta la lipasa a valores situados en el rango de la pancreatitis<sup>309</sup>. Sin embargo, el incremento de la lipasa en estos modelos se produce a partir de las 12 a 24 horas y hasta el tercer día. Este retraso en la aparición de la elevación enzimática podría estar relacionado con el tipo y resultado de la agresión sobre la célula acinar. En los modelos de I/R y trasplante pancreático existe un importante grado de apoptosis<sup>297,331</sup>, mientras que en la pancreatitis predomina la necrosis celular<sup>255</sup>. Por otro

lado, en un estudio sobre la obstrucción de la circulación del páncreas *in situ* no se demuestran cambios en la actividad lipasa plasmática tras 60 minutos de isquemia, pero sí un aumento significativo a las 2 horas de la reperfusión. Una isquemia de 3 horas sin reperfusión provoca solo un moderado aumento de la lipasa plasmática<sup>294</sup>.

La variabilidad en los resultados de la literatura referente a los modelos de isquemia-reperfusión responde a diferentes causas. Entre ellas las diferencias en los diseños experimentales, la duración de la isquemia, la extensión del campo isquémico o la especie animal empleada<sup>282</sup>.

El análisis comparativo de la mieloperoxidasa pancreática entre el grupo de pancreatitis y el injerto pancreático del grupo de trasplante muestra una elevación significativa de la enzima en ambos grupos respecto del control, siendo además significativamente muy superior en el injerto. La migración de los leucocitos polimorfonucleares al páncreas es un elemento importante y temprano en el curso de la pancreatitis aguda grave y un hecho ampliamente demostrado en la literatura<sup>122,255</sup>. Sin embargo, los factores que provocan la migración y activación de estas células en la pancreatitis aguda siguen siendo motivo de controversia. Entre estos factores destaca la propia necrosis pancreática, si bien no se pueden descartar otras fuentes de factores quimiotácticos como los productos de la traslocación bacteriana<sup>54</sup>. Por otro lado, el aumento de la mieloperoxidasa pancreática aparecido en nuestro estudio tras la reperfusión del injerto en el trasplante es consistente con el que existe en otros estudios<sup>329</sup> e indica la masiva migración de neutrófilos y su

---

secuestro en el órgano. La lesión de la microcirculación es el factor más importante en la lesión por I/R, y aunque puedan existir otros factores implicados, parece que la participación de la célula endotelial es de una importancia capital en la relación entre la I/R y la infiltración tisular por neutrófilos<sup>325</sup>.

En la actualidad existe un creciente interés por los factores vasculares en la pancreatitis aguda. La necrosis del tejido pancreático y peripancreático es reconocida como un elemento clave en la evolución de la enfermedad de leve a grave. La cuestión es si esta lesión necrotizante es causada por enzimas o por la isquemia. El papel exacto de la isquemia en la patogénesis de la pancreatitis aguda es desconocido. Algunos estudios experimentales han demostrado que la isquemia tiene poco efecto sobre el páncreas, mientras otros han mostrado asociación con la lesión glandular<sup>308</sup>. La pancreatitis aguda se asocia con una reducción del flujo sanguíneo intrapancreático y la aparición de RLO. El papel del endotelio en la patogénesis de la enfermedad ha sido motivo de estudio<sup>294</sup>. De nuestros resultados se desprendería la idea de que, pese a que en la pancreatitis aguda la infiltración glandular por neutrófilos obedece a diferentes estímulos y entre ellos la necrosis y un cierto grado de lesión endotelial, el poder quimiotáctico de esta agresión glandular es muy inferior al ocurrido por la lesión microvascular establecida en el modelo de trasplante.

Otra posible explicación para la importante reacción inflamatoria local que ocurre en el páncreas tras este modelo de trasplante es la utilización de la solución de preservación de Wisconsin. Recientemente se

ha demostrado que uno de sus componentes, la adenosina, potencia la respuesta inflamatoria tras el trasplante. La adenosina previene algunos efectos de la lesión por I/R, aumenta el flujo sanguíneo, inhibe la producción de RLO, es vasodilatadora y suprime la activación de neutrófilos y la agregación plaquetar, pero estimula la producción de NO por las células endoteliales en una forma dosis dependiente. La adenosina también se produce de forma endógena por la ruptura de nucleótidos de ATP durante la isquemia y se ha demostrado que atenúa la lesión por isquemia cardiaca o hepática. Sin embargo, la adenosina contenida en la solución de preservación provee de substratos para la regeneración de ATP en la reperfusión tras la isquemia fría, y mediante su acción en la liberación de NO aumenta el estrés oxidativo y el reclutamiento de neutrófilos<sup>345</sup>.

A nivel pulmonar, la determinación de MPO muestra un incremento estadísticamente significativo entre los grupos control y pancreatitis. Esto revela la precoz infiltración por neutrófilos a nivel pulmonar tras inducirse la pancreatitis y concuerda con los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo<sup>255</sup> y con otras investigaciones en las cuales se ha visto que la depleción de neutrófilos protege de la lesión pulmonar en la pancreatitis aguda<sup>75,254</sup>. En estos estudios la lesión pulmonar parece ser el resultado de la lesión endotelial local secundaria a RLO derivados de los neutrófilos. En nuestro trabajo la realización de un trasplante isogénico pancreático presenta una elevación de la MPO pulmonar muy superior a la aparecida en la pancreatitis aguda. La lesión por I/R pancreática como inductora de lesión pulmonar ha sido demostrada por otros autores en diferentes

modelos experimentales<sup>215,305</sup>. De nuestros resultados se desprende que la elevación de MPO pulmonar en el grupo de trasplante se relaciona con la inflamación local del injerto pancreático, puesto que la oclusión vascular realizada en el grupo de simulación del trasplante no afecta los niveles pulmonares de esta enzima. Además, al comparar los efectos de la pancreatitis y el trasplante, nuestro estudio parece indicar que a mayor inflamación pancreática, mayor respuesta sistémica. Por otro lado, considerando que en el grupo de trasplante no existe circulación hepática directa de mediadores de origen pancreático, este resultado podría entrar en contradicción con los estudios previos realizados por nuestro grupo, en los que la realización de un shunt porto-cava previo a la pancreatitis abolía la respuesta sistémica pulmonar, demostrando la necesaria participación del hígado en esta respuesta<sup>84</sup>. Sin embargo cabe pensar que al comparar la pancreatitis por taurocolato sódico y el isotrasplante pancreático existen diferencias fisiopatológicas en el modelo de agresión sobre la glándula y en el grado de inflamación local y destrucción glandular obtenido que podrían justificar estos resultados. Se plantean entonces cuestiones sobre cual es la señal para que se produzca la respuesta sistémica y quien la envía.

Las posibles respuestas a estas cuestiones podrían venir de la determinación de los mediadores de la inflamación presentes en la circulación. Estudios experimentales demuestran que la isquemia y posterior reperfusión del intestino en ratas produce una lesión pulmonar y que ésta es en parte mediada por el TNF $\alpha$ <sup>281</sup>. Aunque no está claro el origen de estas citoquinas, algunos estudios apuntan a una producción

local por parte del intestino lesionado más que a una producción hepática<sup>346</sup>. En nuestro estudio, la determinación de los niveles de Rs<sub>1</sub> TNF $\alpha$  en plasma tomado de sangre periférica (cava inferior) muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos control, pancreatitis y trasplante, y los valores medios no superan los 500 pg/ml. Este resultado sorprende porque en otro estudio de nuestro grupo el Rs<sub>1</sub> TNF $\alpha$  había mostrado diferencias significativas en la pancreatitis respecto del grupo control<sup>196</sup>. Además, se ha involucrado a este receptor en los mecanismos de apoptosis, importantes en la lesión por I/R<sup>105</sup>. Sin embargo, los niveles de Rs<sub>2</sub> TNF $\alpha$  en sangre periférica si presentan diferencias significativas, hallándose en todos los casos por encima de 1000 pg/ml y más aumentados en el grupo de trasplante. Estos resultados podrían explicarse si se tiene en cuenta que los Rs<sub>1</sub> TNF $\alpha$  se encuentran en casi todos los tipos celulares, mientras que los Rs<sub>2</sub> TNF $\alpha$  son más característicos de leucocitos y células endoteliales, principales células involucradas en ambos procesos inflamatorios pancreáticos en nuestro estudio.

Los valores de la medición de ambos receptores en plasma a nivel de venas suprahepáticas no muestra diferencias respecto a los obtenidos en cava inferior para ninguno de los tres grupos estudiados. Sin embargo, en el grupo de pancreatitis por taurocolato sódico se observa un incremento porcentual de los valores de Rs<sub>1</sub> TNF $\alpha$  y Rs<sub>2</sub> TNF $\alpha$  en venas suprahepáticas del 25% y del 29% respectivamente. Este hecho sugiere una síntesis hepática o pancreática del mediador en este grupo, aunque este diseño experimental no permite discernir si corresponde a uno u otro

órgano. En el grupo de trasplante la ausencia de diferencias entre ambos puntos de toma de muestra puede sugerir que la liberación masiva de receptores corresponde al injerto. Sin embargo, no puede excluirse la existencia de una síntesis hepática del receptor en el trasplante o de mecanismos diferentes para la síntesis del receptor en ambos procesos inflamatorios.

El análisis mediante técnicas de RT-PCR a nivel hepático del mRNA de diferentes mediadores ofrece una estimación de la síntesis hepática de éstos. En nuestro estudio, la pancreatitis aguda por taurocolato sódico provoca la expresión de mRNA IL-6, mRNA TNF $\alpha$  y de un modo muy intenso de mRNA HSP70. La expresión temprana de mRNA de IL-6 en el páncreas y órganos distantes como el hígado, tras 2 y 6 horas respectivamente de la inducción de una pancreatitis aguda se ha demostrado en la literatura<sup>347</sup>. La expresión del mRNA TNF $\alpha$  también resulta acorde con los hallazgos en otros estudios<sup>245</sup>. En cuanto al mRNA HSP70, la literatura muestra resultados contradictorios. Algunos autores han hallado niveles aumentados de expresión de mRNA HSP70 en el hígado de animales sometidos a pancreatitis inducida por dieta<sup>235</sup>. Dado que la pancreatitis induce una respuesta sistémica, es lógico pensar que la respuesta de shock térmico se active en otros lugares. Sin embargo, tras la realización de una pancreatitis aguda experimental con taurocolato se ha demostrado elevación de HSP72 en pulmón aunque no en el hígado<sup>221</sup>. Esto concuerda con la idea de que en el hígado se pueden generar mediadores inflamatorios durante la pancreatitis, pero no se desarrolla una verdadera respuesta inflamatoria a ese nivel. Sin embargo,

en un estudio reciente también realizado por nuestro grupo, se ha apreciado un aumento en la expresión de mRNA HSP70 hepático tras la inyección de proteína asociada a la pancreatitis (PAP), reflejando una respuesta al estrés por parte de los hepatocitos<sup>245</sup>. Por otra parte, el estudio del mRNA hepático de estos mediadores en el grupo de trasplante muestra la expresión más intensa del mRNA TNF $\alpha$  e IL-6, y algo menor del mRNA HSP70, por tanto una mayor producción de citoquinas pero un menor estrés orgánico que en la pancreatitis. Ello apoya la idea de que en el trasplante, la isquemia y reperfusión del injerto provocan una importante respuesta inflamatoria, que estimula la síntesis hepática de mediadores por la liberación de sustancias que alcanzan el hígado de forma secundaria por la circulación sistémica.

El estudio histológico de la arquitectura pancreática y pulmonar tras la lesión inducida por la administración de taurocolato sódico en nuestro estudio no difiere de las descripciones halladas en la literatura<sup>255</sup>. El páncreas presenta edema septal importante, infiltración por neutrófilos y una necrosis acinar severa y los pulmones muestran infiltración alveolar por neutrófilos y hematíes, así como un engrosamiento de las paredes alveolares. El examen histológico del injerto pancreático tras el trasplante muestra un discreto edema que separa los lóbulos y una intensa infiltración por leucocitos polimorfonucleares, con pequeñas áreas de necrosis e integridad de la estructura acinar, lo que podría corresponder a una pancreatitis leve intersticial homogénea. Todo ello concuerda con las descripciones halladas en la literatura para modelos similares<sup>330</sup>. Estudios experimentales han demostrado que no hay cambios aparentes en el

páncreas tras 1 hora de isquemia sin reperfusión<sup>297</sup>. El análisis de la infiltración leucocitaria muestra valores significativamente más altos en animales sujetos a una hora de isquemia y dos de reperfusión que en los sometidos solo a una o tres horas de isquemia sin reperfusión<sup>294</sup>. Por otro lado, en el modelo de trasplante pancreático el pulmón presenta un importante engrosamiento septal alveolar, con colapso de espacios alveolares y hemorragia, con una infiltración celular semejante a la del grupo de pancreatitis, aunque discretamente aumentada.

**A pesar de compartir fundamentos fisiopatológicos, la lesión pancreática local tras administración intraductal de taurocolato sódico y la obtenida tras el isotrasplante heterotópico de injerto duodeno-pancreático difieren de forma cualitativa y cuantitativa. A las tres horas, en la primera predomina la necrosis glandular y en el trasplante el infiltrado inflamatorio polimorfonuclear, probablemente inducido por la lesión endotelial. La respuesta inflamatoria sistémica a nivel pulmonar producida tras el isotrasplante heterotópico de injerto duodeno-pancreático es superior a la producida en la pancreatitis por administración intraductal de taurocolato sódico. Este hecho es independiente de la circulación hepática directa de los mediadores provenientes del páncreas y parece depender del grado de infiltración inflamatoria local en el páncreas. El hígado participa de forma activa en la respuesta derivada de la inflamación pancreática, aún sin desarrollar inflamación localmente. Existen diferencias en la forma en que se desarrolla esta participación según el modelo de inflamación empleado. En la pancreatitis aguda por**

**administración intraductal de taurocolato sódico existe circulación directa de mediadores provenientes del páncreas, y el hígado responde generando citoquinas y otras proteínas en respuesta a la agresión. Por el contrario, en el isotrasplante heterotópico no existe circulación directa de mediadores, y el hígado, pese a generar mayor número de citoquinas, no presenta una respuesta endógena a la agresión.**

En la segunda parte de nuestro trabajo se estudian las diferencias a nivel local y en la respuesta sistémica entre los modelos de pancreatitis aguda por administración de taurocolato sódico y la realización de una pancreatitis mediante el mismo método en un injerto duodeno-pancreático de trasplante isogénico heterotópico. Se observa que no existen diferencias en cuanto a los niveles de lipasa plasmática, mostrándose elevados en ambos grupos. Los niveles de MPO pancreática son muy superiores en el injerto sometido a pancreatitis. Sin embargo, esto quizás solo traduce la inflamación provocada por la I/R, sin observarse un efecto añadido por la inducción de pancreatitis, puesto que los niveles de MPO en el injerto de este grupo no difieren de forma significativa de los objetivados en el injerto del grupo de trasplante aislado. Se podría decir que la pancreatitis añade una lesión de la célula acinar a un órgano ya de por sí inflamado. Una cuestión que se plantea en este momento es si existe un umbral inflamatorio local máximo, provocado en este caso por la I/R previa a la pancreatitis. El estudio histológico del grupo de trasplante con pancreatitis en el injerto corrobora los hallazgos anteriores, al

---

apreciarse, asociada al infiltrado inflamatorio, una extensa necrosis del injerto ausente en el grupo de trasplante aislado.

A nivel pulmonar existe una diferencia evidente entre las consecuencias de la pancreatitis y del trasplante con pancreatitis en el injerto. La respuesta sistémica es más importante en el grupo de trasplante con pancreatitis, probablemente en relación a una mayor inflamación local pancreática provocada por la isquemia-reperfusión, y ello ocurre a pesar de no presentar paso hepático de mediadores. Esta respuesta no es diferente de la hallada al realizar el trasplante isogénico heterotópico aislado, lo que sugiere la existencia de un umbral máximo de inflamación sistémica. Los hallazgos de la histología pulmonar también se correlacionan con los parámetros bioquímicos. Por otro lado, en la sangre periférica del grupo de trasplante y pancreatitis del injerto destaca un aumento significativo en los niveles de ambos tipos de receptor soluble del TNF $\alpha$ , respecto del grupo de pancreatitis e incluso respecto al trasplante aislado. Esta elevación podría suponer que al realizar dos estímulos nocivos sobre la glándula pancreática existe un doble mecanismo aditivo para la síntesis de esta citoquina, o lo que es lo mismo, a mayor lesión glandular más síntesis de TNF $\alpha$ . Algunos estudios han valorado la utilidad de la determinación de los RsTNF $\alpha$  para medir la severidad de la inflamación pancreática. Kaufmann ha observado que las concentraciones plasmáticas de Rs<sub>1</sub>TNF $\alpha$  son superiores en pacientes con pancreatitis grave que en formas leves de la enfermedad. Esta elevación se correlaciona positivamente con anomalías en parámetros fisiológicos, desarrollo de FMO y mortalidad. La asociación con la necrosis

pancreática sugiere que mediante la regulación de los efectos del TNF $\alpha$ , el Rs<sub>1</sub>TNF $\alpha$  refleja la lesión tisular inflamatoria que conduce a complicaciones sistémicas. La sensibilidad y especificidad de las concentraciones plasmáticas de RsTNF $\alpha$  para la predicción de pancreatitis aguda severa fueron del 90 y 100% respectivamente<sup>348</sup>.

En cuanto a la expresión hepática del mRNA respecto de la pancreatitis, en el grupo de pancreatitis y trasplante en el injerto se expresa más intensamente la IL-6 y el TNF $\alpha$  y no se expresa la HSP70, tal como ocurre en el grupo de trasplante aislado. Ello implica que en el trasplante con pancreatitis en el injerto se producen a nivel hepático gran cantidad de citoquinas, aún sin circulación hepática directa de mediadores, y que no se produce una agresión directa sobre el hígado.

**La administración intraductal de taurocolato sódico sobre el injerto de un isotrasplante heterotópico pancreático provoca una necrosis acinar añadida a la inflamación local. Existe un aumento de las citoquinas en circulación sistémica respecto de los modelos aislados de pancreatitis inducida por taurocolato sódico y de isotrasplante. La respuesta sistémica pulmonar de la pancreatitis del injerto es superior a la que aparece tras una pancreatitis sobre órgano nativo, pero no a la provocada por el injerto sin pancreatitis, lo que sugiere la existencia de un umbral inflamatorio máximo alcanzado tras el síndrome de isquemia-reperfusión.**

En la tercera parte de nuestro estudio se comparan las lesiones local y sistémica provocadas tras la realización de un trasplante con pancreatitis sobre el órgano nativo o sobre el injerto. En ambos casos la

lipasa plasmática se halla elevada en rangos de pancreatitis. La MPO pancreática se halla elevada en el órgano nativo con pancreatitis, mientras que es muy superior y sin diferencias en ambos injertos pancreáticos, independientemente de la realización de una pancreatitis sobre el injerto. Tampoco existen diferencias entre los niveles de MPO pulmonar, siendo muy elevadas en ambos casos. Los niveles plasmáticos de  $R_sTNF\alpha$  son en ambos casos superiores a los mostrados en el grupo de trasplante aislado. No hay diferencias significativas en los niveles de  $Rs_1TNF\alpha$  entre ambos grupos. Sin embargo, los niveles de  $Rs_2TNF\alpha$  son superiores en el grupo de trasplante con pancreatitis en el órgano nativo, lo que induce a pensar que la lesión sobre dos órganos tiene mayor capacidad proinflamatoria que la doble agresión sobre el mismo páncreas. Sin embargo, no puede descartarse que este efecto se deba en parte a una mayor estimulación hepática por la llegada vía portal de mediadores producto de la pancreatitis en órgano nativo. De hecho, en el grupo de trasplante con pancreatitis en el nativo, se expresa intensamente el mRNA de IL-6, como correspondería a todos los grupos de trasplante, pero la expresión hepática de  $TNF\alpha$  y HSP70 también es superior al grupo de pancreatitis en el injerto (figura 67).

**Aunque el isotrasplante con pancreatitis en el órgano nativo presenta a nivel hepático una respuesta endógena a la agresión condicionada por el paso directo de mediadores provenientes del páncreas, no existen diferencias significativas en la respuesta sistémica tras la realización de un isotrasplante aislado o con pancreatitis en el injerto o en el órgano nativo.**

A la luz de los resultados de este trabajo se puede inferir que la respuesta sistémica a la inflamación pancreática depende de varios factores. Entre ellos parece tener mucha importancia el grado de infiltración inflamatoria local, siendo incluso más importante que el grado de destrucción acinar por necrosis. Esto contradice en parte a algunos autores, que postulan que la severidad de la pancreatitis aguda está relacionada con el tipo y grado de muerte celular<sup>272</sup>. Sin embargo otro hecho importante en contra de ello parece ser que en los modelos de pancreatitis aguda en los que se consigue una disminución de la activación del tripsinógeno, aunque se disminuya el grado de necrosis acinar, no se consigue disminuir la respuesta inflamatoria sistémica (ni el infiltrado leucocitario a nivel pancreático ni el grado de alteración histológica pulmonar). También parece evidente la participación del hígado en la génesis de esta respuesta inflamatoria sistémica, aún en los casos sin paso directo de mediadores a través de la circulación portal.

---

## **7 Conclusiones**

En base a los resultados de este estudio podemos concluir que en los modelos experimentales desarrollados:

- **La lesión por isquemia-reperfusión pancreática tiene mayor poder quimiotáctico local que la necrosis celular desarrollada por la administración intraductal de taurocolato sódico.**

- **La magnitud de la respuesta inflamatoria sistémica a nivel pulmonar depende más del grado de infiltración inflamatoria local en el páncreas que de la cantidad de necrosis y destrucción acinar. A mayor respuesta inflamatoria local, mayor respuesta sistémica.**

- **El hígado participa de forma activa en la génesis de la respuesta sistémica derivada de la inflamación pancreática,**

**independientemente del paso hepático directo de mediadores por la circulación portal.**

- **La administración intraductal de taurocolato sódico sobre el injerto de un isotrasplante heterotópico pancreático provoca una respuesta sistémica pulmonar de mayor intensidad que la pancreatitis sobre órgano nativo.**

- **La similitud entre la respuesta sistémica pulmonar de la pancreatitis del injerto y de la realización de un trasplante aislado, pese a existir un aumento de las citoquinas en circulación sistémica, sugiere la existencia de un umbral máximo de respuesta inflamatoria sistémica.**

- **La presencia de tejido pancreático viable no modifica la respuesta inflamatoria sistémica a la inflamación pancreática.**

---

## 8 Bibliografía

1. Ishiguro H, Naruse S, San Román JI, Case RM, Steward MC. **Pancreatic ductal bicarbonate secretion: past, present and future.** *Journal of Pancreas* 2001; 2: 192-197.
2. Peters J, Jürgensen A, Klöppel G. **Ontogeny, differentiation and growth of the endocrine pancreas.** *Virchow Archives* 2000; 436: 527-538.
3. Sánchez-Bernal C, San Román JI, López MA, Calvo JJ. **Fisiología y bioquímica del páncreas.** En: Salvador Navarro, Miguel Pérez-Mateo, Luisa Guarner, eds. Tratado de páncreas exocrino. Barcelona: J & C. Ediciones Médicas S. L., 2002.
4. Singer MV. **Neurohormonal control of pancreatic enzyme secretion in animals.** En: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. The Pancreas. Biology, Pathology and Diseases. New York: Raven Press, 1993: 425-448.
5. Carter DC. **Physiology of the pancreas.** En: Trede M., Carter DC, eds. Surgery of the pancreas. New York: Churchill-Livingstone, 1997: 29-48.
6. Fitz RH. **Acute pancreatitis, a consideration of pancreatic hemorrhage: hemorrhagic, suppurative and gangrenous pancreatitis**

- and disseminated fat necrosis.** *Boston Medicine and Surgery Journal* 1889; 120: 181-187, 205-207, 229-235.
7. Bank S, Singh P, Pooran N, Stark B. **Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years.** *Journal of Clinical Gastroenterology* 2002; 35: 50-60.
  8. Eland IA, Sturkenboom MJCM, Wilson JHP, Stricker BHC. **Incidence and mortality of acute pancreatitis between 1985 and 1995.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2000; 10: 1110-1116.
  9. Birgisson H, Moller PH, Birgisson S, Thoroddsen A, Asgeirsson KS, Sigurjonsson SV, Magnusson J. **Acute pancreatitis: a prospective study of its incidence, aetiology, severity, and mortality in Iceland.** *European Journal of Surgery* 2002; 168: 278-282.
  10. Navarro S, Farré A. **Enfermedades del páncreas.** En: Farreras-Rozman, ed. *Medicina Interna*. Vol. 1. Barcelona: Harcourt Brace Publishers International, 1997: 231-248.
  11. Gatell JM, Galindo F, Camp J. **Pancreatitis aguda en el área de Barcelona. Consideraciones epidemiológicas.** *Gastroenterology and Hepatology* 1979; 2: 136-140.
  12. Carballo F, Domínguez-Muñoz JE, Martínez-Pancorbo G, De La Morena J. **Epidemiology of acute pancreatitis.** En: Beger H.G BM, ed. *Standards in pancreatic surgery*. Berlín: Springer-Verlag, 1993: 25-33.
  13. Alvarez Blanco P, Ruiz de Aguiar Gonzalez A, Banares Canizares R. **The epidemiological considerations in acute pancreatitis. A comparison between 2 series.** *Annales de Medicina Interna* 1992; 9: 165-169.
  14. Lankisch PG, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. **Acute pancreatitis: does gender matter?.** *Digestive Diseases and Sciences* 2001; 46: 2470-2474.

15. Moreau JA, Zinsmeister AR, Melton LJr, DiMagno EP. **Gallstone pancreatitis and the effect of cholecystectomy: a population-based cohort study.** *Mayo Clinic Proceedings* 1988; 63: 466-473.
16. Opie EL. **The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis.** *Johns Hopkins Hospital Bulletin* 1901; 12: 19-21.
17. Reber HA, Farner RC, Maslin SC. **Effects of bile on the permeability of the pancreatic duct to macromolecules.** *Gastroenterology* 1982; 82: 1156-1161.
18. Steer ML. **Recent insights into the etiology and pathogenesis of acute biliary pancreatitis.** *American Journal of Roentgenology* 1995; 164: 811-814.
19. Dufour MC, Adamson MD. **The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis.** *Pancreas* 2003; 27: 286-290.
20. Purohit V, Russo D, Salin M, Brown R. **Mechanisms of alcoholic pancreatitis: introduction and summary of the symposium.** *Pancreas* 2003; 27: 281-285.
21. Floyd A, Pedersen L, Nielsen GL, Thorlacius-Ussing O, Sorensen HT. **Risk of acute pancreatitis in users of azathioprine: a population-based case-control study.** *American Journal of Gastroenterology* 2003; 98: 1305-1308.
22. Lankisch PG, Droge M, Gottesleben F. **Drug induced acute pancreatitis: incidence and severity.** *Gut* 1995; 37: 565-567.
23. Kao LS, Bulger EM, Parks DL, Byrd GF, Jurkovich GJ. **Predictors of morbidity after traumatic pancreatic injury.** *Journal of Trauma* 2003; 55: 898-905.
24. Johnson CD. **Pancreatic trauma.** *British Journal of Surgery* 1995; 82: 1153-1154.

25. Burtin P, Person B, Charneau J, Boyer J. **Pancreas divisum and pancreatitis: a coincidental association?** *Endoscopy* 1991; 23: 55-58.
26. Lechleitner M, Ladner E, Seyr M, Hoppichler F, Fogar B, Hackl JM. **Hypertriglyceridemia and acute pancreatitis.** *Acta Medica Austriaca* 1994; 21: 125-128.
27. Masci E, Mariani A, Curioni S, Testoni PA. **Risk factors for pancreatitis following endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a meta-analysis.** *Endoscopy* 2003; 35: 830-834.
28. Fernández del Castillo C, Rattner DW, Warshaw AL. **Acute pancreatitis.** *Lancet* 1993; 342: 475-478.
29. Miquel R. **Pancreatitis. Anatomía patológica.** En: Navarro S P-MM, Guarner L., ed. Tratado de páncreas exocrino. Barcelona: J & C Ediciones Médicas S. L., 2002: 139-141.
30. Sarles H, Adler G, Dani R, Frey C, Gullo L, Harada H, Martin E, Norohna M, Scuro LA. **Proposal adopted unanimously by the participants of the Symposium on Pancreatitis at Marseille.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1989; 24: 641-642.
31. Bradley ELI. **A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta September 11 through 13, 1992.** *Archives of Surgery* 1993; 128: 586-590.
32. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer J. **Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis.** *Surgery Gynecology and Obstetrics* 1974; 174: 69-81.
33. Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J, Gilmour WH, Carter DC. **Prognostic factors in acute pancreatitis.** *Gut* 1984; 25: 1340-1346.

34. Imrie CW, Beastall GH, Allam BF, O'Neill J, Benjamin IS, McKay CJ. **Parathyroid hormone and calcium homeostasis in acute pancreatitis.** *British Journal of Surgery* 1978; 65: 717-720.
35. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. **APACHE II: a severity of disease classification system.** *Critical Care Medicine* 1985; 13: 818-829.
36. Al-Hadeedi S, Fan ST, Leaper D. **APACHE-II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis.** *Lancet* 1989; 2: 738.
37. Tran DD, Cuesta MA. **Evaluation of severity in patients with acute pancreatitis.** *American Journal of Gastroenterology* 1992; 87: 604-608.
38. Uhl W, Buchler M, Malfertheiner P, Martini M, Beger HG. **PNM elastase in comparison with CRP, antiproteases and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis.** *Pancreas* 1991; 6: 253-259.
39. Clavien PA, Hauser H, Meyer P. **Value of contrast-enhanced CT in the early diagnosis and prognosis of acute pancreatitis: a prospective study of 202 patients.** *American Journal of Surgery* 1988; 155: 457-466.
40. **Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis.** *Radiology* 1990; 174: 331-336.
41. Nagai H, Henrich H, Wunsch PH, Fischbach W, Mössner J. **Role of pancreatic enzymes and their substrates in auto-digestion of the pancreas. In vitro studies with isolated rat pancreatic acini.** *Gastroenterology* 1989; 86: 838-847.
42. Hartwig W, Werner J, Jimenez RE, Z'Graggen K, Weinmann J, Lewandrowski KB. **Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury.** *American Journal of Physiology* 1999; 277: G1008-G1016.

43. McCutcheon AD, Race DS. **Experimental pancreatitis: a possible etiology of post-operative pancreatitis.** *Annals of Surgery* 1962; 155: 523-531.
44. Lerch MM, Saluja AK, Runzi M, Dawra R, Saluja M, Steer ML. **Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum.** *Gastroenterology* 1993; 104: 853-861.
45. Steer ML. **How and where does acute pancreatitis begin?** *Archives of Surgery* 1992; 127: 1350-1353.
46. Saluja AK, Saluja M, Printz H, Zaverinik A, Sengupta A, Steer ML. **Experimental pancreatitis is mediated by low affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 8968-8971.
47. Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. **Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet.** *American Journal of Pathology* 1975; 79: 465-480.
48. Cook LJ, Musa OA, Case RM. **Intracellular transport of pancreatic enzymes.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1996; 31 (Suppl 219): 1-5.
49. Hirano T, Saluja A, Ramarao P, Lerch MM, Saluja M, Steer ML. **Apical secretion of lysosomal enzymes in rabbit pancreas occurs via a secretagogue related pathway and is increased after pancreatic duct obstruction.** *Journal of Clinical Investigation* 1991; 87: 865-869.
50. Steer ML, Meldonesi J, Figarella C. Pancreatitis. **The role of lysosomes.** *Digestive Diseases and Science* 1984; 29: 934-938.
51. Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS. **Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high**

- doses of cholecystokinin.** *Journal of Clinical Investigation* 1991; 87: 362-366.
52. Zyromsky N, Murr MM. **Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis.** *Surgery* 2003; 133: 235-237.
53. Waldo SW, Rosario HS, Penn AH, Schmid-Schönbein GW. **Pancreatic digestive enzymes are potent generators of mediators for leukocyte activation and mortality.** *Shock* 2003; 20: 138-143.
54. Gross V, Leser H-G, Heinisch A, Schölmerich J. **Inflammatory mediators and cytokines. New aspects of the pathophysiology and assesment of severity of acute pancreatitis?** *Hepato-Gastroenterology* 1993; 40: 522-530.
55. Nevalainen TJ. **Phospholipase A2 in acute pancreatitis.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1988; 23: 897-904.
56. Balldin G. **Release of vasoactive substances in ascites and blood in acute pancreatitis.** In: Beger H.G. BM, ed. *Acute pancreatitis: research and clinical management.* Berlin: Springer-Verlag, 1987: 63-70.
57. Rinderknecht H. **Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation?.** *International Journal of Pancreatology* 1988; 3: 105-112.
58. Büchler M, Malfertheiner P, Uhl W, Scholmerich J, Stockmann F, Adler G, Gaus W, Rolle K, Beger HG. **Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group.** *Gastroenterology* 1993; 104: 1165-1170.
59. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J. **Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.** *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 773-781.

60. Closa D, Bulbena O, Roselló-Catafau J, Fernández-Cruz L, Gelpí E. **Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxigen free radical production in experimental acute pancreatitis.** *Inflammation* 1993; 17: 563-571.
61. Liu X, Nakano I, Yamaguchi H, Ito T, Goto M, Koyanagi S, Kinjoh M, Nawata H. **Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats.** *Digestive Diseases and Sciences* 1995; 40: 2162-2169.
62. Folch E, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Closa D. **Free radicals generated by xantine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure.** *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43: 2405-2410.
63. Kingsnorth A. **Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis.** *Gut* 1997; 40: 1-4.
64. Lundberg AH, Granger DN, Russell J, Sabek, Sabek O, Henry J, Gaber L, Kotb M, Gaber O. **Quantitative measurement of P- and E- selectin adhesion molecules in acute pancreatitis. Correlation with distant organ injury.** *Annals of Surgery.* 2000; 231: 213-222.
65. Dib M, Zhao X, Wang X, Andersson E, Drewsen G, Andersson R. **Acute phase response in acute pancreatitis: a comparison with abdominal sepsis.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2003; 38: 1072-1077.
66. Folch E, Salas A, Panés J, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Anderson DC, Navarro S, Piqué JM, Fernández-Cruz L, Closa D. **Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats.** *Annals of Surgery* 1999; 230: 792-799.
67. Nakae H, Endo S, Sato N, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. **Involvement of soluble adhesion molecules in acute pancreatitis.** *European Surgical Research* 2001; 33: 377-382.

- 
68. Mann DV, Hershman MJ, Hittinger R, Glazer G. **Multicentre audit of death from acute pancreatitis.** *British Journal of Surgery* 1994; 81: 890-893.
  69. Cicalese L, Sahai A, Sileri P, Rastellini C, Subbotin V, Ford H, Lee K. **Acute pancreatitis and bacterial translocation.** *Digestive Diseases and Sciences* 2001; 46: 1127-1132.
  70. Bradley ELr, Hall JR, Lutz J, Hamner L, Lattouf O. **Hemodynamic consequences of severe pancreatitis.** *Annals of Surgery* 1983; 198: 130-133.
  71. Pitchumoni CS, Agarwal N, Jain NK. **Systemic complications of acute pancreatitis.** *American Journal of Gastroenterology* 1988; 83: 597-606.
  72. Altimari AF, Prinz RA, Leutz DW, Sandberg L, Kober PM, Raymond RM. **Myocardial depressions during acute pancreatitis: fact or fiction?.** *Surgery* 1986; 100: 724-730.
  73. Zhang Q, Ni Q, Cai D, Zhang Y, Zhang N, Hou L. **Mechanisms of multiple organ damages in acute necrotizing pancreatitis.** *Chinese Medical Journal* 2001; 114: 738-742.
  74. Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. **Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights.** *Chest* 2003; 124: 2341-2351.
  75. Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward PA. **Neutrophil-dependent, oxigen radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis.** *Annals of Surgery* 1989; 210: 740-747.
  76. Kes P, Vucicevic Z, Ratkovic-Gusic I, Fotivec A. **Acute renal failure complicating severe acute pancreatitis.** *Renal Failure* 1996; 18: 621-628.
  77. Ljutic D, Piplovic-Vukovic T, Raos V, Andrews P. **Acute renal failure as a complication of acute pancreatitis.** *Renal Failure* 1996; 18: 629-33.

78. Werner MH, Hayes DF, Lucas CE, Rosenberg IK. **Renal vasoconstriction in association with acute pancreatitis.** *American Journal of Surgery* 1974; 127:185-190.
79. Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. **Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis.** *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2003; 7: 26-35.
80. Ederoth P, Sun Z, Nordstrom C-H, Andersson R. **Experimental pancreatitis cause acute perturbation of energy metabolism in the intestinal wall.** *Pancreas* 2002; 25: 270-276.
81. Wang XD, Wang Q, Anderson R, Ihse I. **Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model.** *British Journal of Surgery* 1996; 83: 1537-1543.
82. Swank GM, Deitch EA. **Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes.** *World Journal of Surgery* 1996; 20: 411-417.
83. Mozzhelin ME, Vengerovskii AI, Sukhodolo V, Sarakitov AS. **Liver damages during experimental acute pancreatitis.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2001; 1: 647-649.
84. Closa D, Bardají M, Hotter G, Prats N, Gelpí E, Fernández-Cruz L, Roselló-Catafau J. **Hepatic involvement in pancreatitis induced lung damage.** *American Journal of Physiology* 1996; 270: G6-G13.
85. Yang F, Fier A, Carter Y, Liu G, Epling-Burnette PK, Bai F, Loughran TP, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. **Liver injury during acute pancreatitis: the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis.** *Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2003; 7: 200-208.
86. Desai TK, Carlson RW, Geheb MA. **Prevalence and clinical implications of hypocalcemia in acutely ill patients in a medical intensive care setting.** *American Journal of Medicine* 1988; 84: 209-214.

- 
87. Frick TW, Hailemariam S, Heitz PU, Largiader F, Goodale RL. **Acute hypercalcemia induces acinar cell necrosis and intraductal protein precipitates in the pancreas of cats and guinea pigs.** *Gastroenterology* 1990; 98: 1675-1681.
  88. Ohlsson K, Genell S. **Pathophysiology of acute pancreatitis.** En: Johnson CD, Imrie CW, eds. *Pancreatic disease. Progress and prospects.* Londres: Springer-Verlag, 1991:213-225.
  89. Schuster MH, Iber FL. **Psychosis with pancreatitis.** *Archives of Internal Medicine* 1965; 116: 228-233.
  90. Boon P, de Reuck J, Achten E, de Bleecker J. **Pancreatic encephalopathy. A case report and review of the literature.** *Clinical Neurology and Neurosurgery* 1991; 93: 137-141.
  91. Wells AD, McDonnell PJ, Burnand KJ. **Purtscher's retinopathy in acute pancreatitis.** *British Journal of Surgery* 1990; 77: 820.
  92. Semlacher EA, Chan-Yan C. **Acute pancreatitis presenting with visual disturbance.** *American Journal of Gastroenterology* 1993; 88: 756-759.
  93. Higgins E, Ive FA. **Subcutaneous fat necrosis in pancreatic disease.** *British Journal of Surgery* 1990; 77: 75-87.
  94. Hammond J, Tesar J. **Pancreatitis-associated arthritis. Sequential study of synovial fluid abnormalities.** *Journal of the American Medical Association* 1980; 244: 694-696.
  95. Le Mee J, Paye F, Sauvanet A, O'Toole D, Hammel P, Marty J, Ruszniewski P, Belghiti J. **Incidence and reversibility of organ failure in the course of sterile or infected necrotizing pancreatitis.** *Archives of Surgery* 2001; 136: 1386-1390.

96. Malangoni MA, Richardson JD, Shallcross JC, Seiler JG, Polk HCJ. **Factors contributing to fatal outcome after treatment of pancreatic abscess.** *Annals of Surgery* 1986; 203: 605-613.
97. Dong JH. **Multiple organ failure following severe acute pancreatitis: its clinically patterns and pathogenetic factors.** *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1992; 30: 402-4034, 443.
98. Bone RC. **Sir Issac Newton, sepsis, SIRS and CARS.** *Critical Care Medicine* 1996; 24: 1125-1128.
99. Laskin DL, Pendino KJ. **Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1995; 35: 655-677.
100. Adams DO, Hamilton TA. **The cell biology of macrophage activation.** *Annual Review of Immunology.* 1984; 2: 283-318.
101. Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T. **Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 2003; 124: 725-36.
102. Cavaillon JM. **Cytokines and macrophages.** *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 1994; 48: 445-453.
103. Yang J, Denham W, Tracey KJ, Wang H, Kramer AA, Salhab KF, Norman J. **The physiologic consequences of macrophage pacification during severe acute pancreatitis.** *Shock* 1998; 10:169-75.
104. Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. **Cytokines and acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 1996; 110: 639-642.
105. Makhija R, Kingsnorth AN. **Cytokine storm in acute pancreatitis.** *Journal of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery* 2002; 9: 401-410.
106. McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN. **Increased monocyte cytokine production in association with systemic**

- complications in acute pancreatitis.** *British Journal of Surgery* 1996; 83: 919-923.
107. Fink G, Norman JG. **Intrapancreatic cytokine production by specific leukocyte populations during experimental acute pancreatitis.** *Journal of Surgical Research* 1996; 63: 369-373.
108. Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. **Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis.** *Digestive Diseases and Sciences* 1997; 42: 1783-1788.
109. Schleicher C, Baas JC, Esler H, Baba HA, Senninger N. **Reticuloendothelial system blockade promotes progression from mild to severe acute pancreatitis in the opossum.** *Annals of Surgery* 2001; 233: 528-536.
110. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodríguez F, López F. **Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion.** *Circulatory Shock* 1994; 42: 204-209.
111. Luster MI, Germolec DR, Yoshida T, Kayama F, Thompson M. **Endotoxin induced cytokine gene expression and excretion in the liver.** *Hepatology* 1994; 19: 480-488.
112. Yang J, Denham W, Carter G, Tracey KJ, Norman J. **Macrophage pacification reduces rodent pancreatitis-induced hepatocellular injury through down-regulation of hepatic tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukine 1 $\beta$ .** *Hepatology* 1998; 28: 1282-1288.
113. Bautista AP, Schuler A, Spolarics Z, Spitzer JJ. **Tumor necrosis factor stimulates superoxide anion generation by Kupffer cells.** *American Journal of Physiology.* 1991: G891-895.
114. Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. **Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine**

- production within Kupffer cells via nuclear factor kappa B.** *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2002; 6: 474-480.
115. Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, Reber, HA. **Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats.** *Pancreas* 2000; 21: 414-420.
116. Pendino KJ, Shuler RL, Laskin JD, Laskin DL. **Enhanced production of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha and fibronectin by rat lung phagocytes following inhalation of a pulmonary irritant.** *American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology.* 1994; 11:279-286.
117. Bhatia M, Moochhala S. **Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome.** *Journal of Pathology* 2004; 202: 145-156.
118. Aldridge AJ. **Role of neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome.** *European Journal of Surgery.* 2002: 204-214.
119. Weis SJ. **Tissue destruction by neutrophils.** *New England Journal of Medicine* 1989: 365-376.
120. Liras G, Carballo F. **An impaired phagocyte function is associated with leucocyte activation in the early stages of severe acute pancreatitis.** *Gut* 1996; 39: 39-42.
121. Domínguez-Muñoz JE, Carballo F, García MJ, de Diego JM, Rabago L, Simón MA, De La Morena J. **Clinical usefulness of polymorphonuclear elastase in predicting the severity of acute pancreatitis: Results of a multicentre study.** *British Journal of Surgery* 1991; 78: 1230-1234.
122. Scholmerich J, Sehumichen C, Lawen M, Gross V, Leser H-G, Lay L, Farthmann EH, Gerok V. **Scintigraphic assessment of leukocyte infiltration in acute pancreatitis using technetium-99m-hexamethyl**

- propilene amine oxine as leukocyte label.** *Digestive Diseases and Sciences* 1991; 36: 65-70.
123. Osman MO, Jensen ST. **Acute pancreatitis: The pathophysiological role of cytokines and integrins. New trends for treatment.** *Digestive Surgery.* 1999; 16: 347-362.
124. Mitsouka H, Kistler EB, Schmid-Schönbein GW. **Protease inhibition in the intestinal lumen: attenuation of systemic inflammation and early indicators of multiple organ failure in shock.** *Shock* 2002; 17: 205-209.
125. Holman RG, Maier RV. **Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome.** *Archives of Surgery* 1988; 123: 1491-1495.
126. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB Jr, Henson PM, Worthen GS. **Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase.** *Journal of Clinical Investigation* 1986; 77: 1233-1246.
127. Parsons PE, Worthen GS, Moore EE, Tate RM, Henson PM. **The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome.** *American Review of Respiratory Disease* 1989; 140: 294-301.
128. Solomkin JS, Cotta LA, Satoh PS, Hurst JM, Nelson RD. **Complement activation and clearance in acute illness and injury: evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man.** *Surgery* 1985; 97: 668-678.
129. Kyriakides C, Jasleen J, Wang Y, Moore FDJ, Ashley SW, Hechtman HB. **Neutrophils, not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis.** *Pancreas* 2001; 22: 40-46.
130. Closa D, Bulbena G, Hotter G, Roselló-Catafau J, Fernández-Cruz L, Gelpí E. **Xanthine oxidase activation in cerulein- and taurocholate-**

- induced acute pancreatitis in rats.** *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie et de Biophysics* 1994; 102: 167-170.
131. Sun Z, Wang X, Lasson A, Börjesson A, Leveau P, Haraldsen P, Andersson R. **Roles of platelet-activating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 in intestinal barrier in intestinal barrier dysfunction induced by mesenteric arterial ischemia and reperfusion.** *Journal of Surgical Research* 1996; 87: 90-100.
132. Marcus BC, Wyble CW, Hynes KL, Gewert BL. **Cytokine induced increases in endothelial permeability occur after adhesion molecule expression.** *Surgery* 1996; 120: 411-416.
133. Blann AD, Seigneur M. **Soluble markers of endothelial cell function.** *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 1997; 17: 3-11.
134. Powell JJ, Siriwardena AK, Fearon KC, Ross JA. **Endothelial-derived selectins in the development of organ dysfunction in acute pancreatitis.** *Critical Care Medicine* 2001; 29: 567-72.
135. Albelda SM, Buck CA. **Integrins and other adhesion molecules.** *FASEB Journal* 1990; 4: 2868-2880.
136. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. **PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes.** *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178: 449-460.
137. Kylänpää-Bäch ML, Takala A, Kempainen E, Poulakkainen P, Kautiainen H, Janson SE, Haapiainen R, Repo H. **Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2001; 36: 1100-1107.
138. Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. **Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis. Experimental findings and clinical implications.** *Digestive Diseases and Sciences* 2002; 47: 130-138.

- 
139. Foitzik T, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. **Endothelin mediates local and systemic sequelae in severe experimental pancreatitis.** *Pancreas* 2001; 22: 248-254.
140. Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. **ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury.** *Journal of Surgical Research* 1999; 85: 301-310.
141. Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Hotz B, Kirchengast M, Buhr HJ. **Therapy of microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: effect of platelet-activating factor blockade vs. endothelin receptor blockade.** *Journal of Gastrointestinal Surgery* 1999; 3: 244-251.
142. Gilbert DL. **Oxygen and living processes.** En: Gilbert DL, ed. Oxygen and living processes. An interdisciplinary approach. New York: Springer-Verlag, 1981.
143. Basaga HS. **Biochemical aspects of free radicals.** *Biochemistry and Cell Biology* 1989; 68: 989-998.
144. Janero DR. **Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.** *Free Radical Biology and Medicine* 1990; 9: 515-540.
145. Schoenberg MH, Beger HG. **The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis and its clinical implications.** En: Devernis CG, ed. Advances in pancreatic disease. Molecular biology, diagnosis and treatment. Stuttgart: Springer-Verlag, 1996:114-123.
146. Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB, McCord JM. **Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues.** *Free Radical Research Communications* 1991; 12: 681-689.
147. Granger DN, Rutili G, McCord JM. **Superoxide radicals in feline intestinal ischemia.** *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.

- 148 Terada LS, Hybertson BM, Connelly KG, Weill D, Piermattei D, Repine JE. **XO increases neutrophil adherence to endothelial cells by a dual ICAM-1 and P-selectin-mediated mechanism.** *Journal of Applied Physiology* 1997; 82: 866-873.
149. Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalmann A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. **Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental pancreatitis.** *Pancreatology* 2003; 3: 156-163.
- 150 Lum H, Roebuck KA. **Oxidant stress and endothelial cell dysfunction.** *American Journal of Physiology* 2001; 280: C719-C741.
151. Kuklinski B, Zimmermann T, Schweder R. **Decreasing mortality in acute pancreatitis with sodium selenite. Clinical results of 4 years antioxidant therapy.** *Medizinische Klinik* 1995; 90 Suppl 1: 36-41.
152. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. **The pathogenesis of acute pancreatitis: the source and role of oxygen free radicals in three different experimental models.** *Annals of Surgery* 1985; 201: 633-639.
153. Budzynska A, Marek T, Nowak A, Kaczor R, Nowakowska-Dulawa E. **A prospective, randomized, placebo-controlled trial of prednisone and allopurinol in the prevention of ERCP-induced pancreatitis.** *Endoscopy* 2001; 33: 766-72.
154. Sanfey H, Targarona EM, Fernández-Cruz L. **Radicales libres de oxígeno y pancreatitis aguda.** *Gastroenterología y Hepatología* 1991; 14: 172-180.
155. Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps I, Vina J, Sastre J.. **Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications.** *Current Drug Targets of Inflammation and Allergy* 2002; 1:393-403.
156. Gilgenast O, Brandt-Nedelev B, Wiswedel I, Lippert H, Halangk W, Reinheckel T. **Differential oxidative injury in extrapancreatic tissues**

- during experimental pancreatitis. **Modification of lung proteins by 4-hydroxynonenal.** *Digestive Diseases and Sciences* 2001; 46: 932-937.
157. Granell S, Gironella M, Bulbena O, Panés J, Mauri M, Sabater L, Aparisi L, Gelpí E, Closa D. **Heparin mobilizes xanthine oxidase and induces lung inflammation in acute pancreatitis.** *Critical Care Medicine* 2003; 31: 525-530.
158. Tasaka S, Hasegawa N, Ishizaka A. **Pharmacology of acute lung injury.** *Pulmonar Pharmacology and Therapeutics* 2002; 15: 83-95.
159. Burr GO, Burr MM. **On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition.** *Journal of Biological Chemistry* 1930; 86: 587-590.
160. Kurzok R, Lieb CC. **Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1935; 28: 208-215.
161. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. **Thromboxanes. A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975; 72: 2944-2998.
162. Moncada S, Gryglewski RJ, Bunting S, Vane JR. **An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.** *Nature* 1976; 263: 663-665.
163. Lewis RA, Austen KF, Drazen JM, Soter NA, Figueiredo JC, Corey EJ. **Structure, function and metabolism of leukotriene constituents of SRS-A.** *Advances in Prostaglandin Thromboxane and Leukotriene Research* 1982; 9: 137-151.
164. Serhan CN. **Lipoxins: Eicosanoids carrying intra- and intercellular messages.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1991; 23:105-122.

165. Van der Bosch H. **Intracellular phospholipases A.** *Biochemical and Biophysical Acta* 1980; 604: 191-246.
166. Masferrer JL, Seibert K. **Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids.** *Receptor* 1994; 4: 25-30.
167. Smith WL. **Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2.** *Advances in Immunology* 1996; 62: 167-215.
168. Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GJD, Steer ML, Saluja AK. **Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury.** *American Journal Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2002; 283: G1166-G1174.
169. Holtzman MJ. **Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease.** *American Review of Respiratory Disease* 1991; 143: 188-203.
170. Standfield NJ, Kakkar VV. **Prostaglandins and acute pancreatitis--experimental and clinical studies.** *British Journal of Surgery* 1983; 70: 573-6.
171. Glazer G, Gilliland EL, Aldridge MA. **The role of prostaglandins in acute pancreatitis.** *Surgical Annals* 1987; 19: 1975-2003.
172. Martrat A, Roselló-Catafau J, Closa D, Hotter G, Vargas D, Fernández-Cruz L, Gelpí E. **Altered systemic and tissue prostacyclin in cerulein induced pancreatitis in rats.** *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1992; 46: 261-264.
173. Yiannacou N. **The microvasculature of the pancreas in acute pancreatitis.** En: Devernys CG, ed. *Advances in pancreatic disease. Molecular biology, diagnosis and treatment.* Stuttgart: Springer-Verlag, 1996:109-113.
174. Closa D, Roselló-Catafau J, Hotter G, Bulbena O, Fernández-Cruz L, Gelpí E. **Cyclooxygenase and lipoxigenase metabolism in sodium**

- taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats.** *Prostaglandins* 1993; 45: 315-322.
175. Closa D, Roselló-Catafau J, Martrat A. **Changes of systemic prostacyclin and thromboxane A2 in sodium taurocholate- and cerulein-induced acute pancreatitis.** *Digestive Diseases and Sciences* 1993; 38: 33-38.
176. Closa D, Roselló-Catafau J, Fernández-Cruz L, Gelpí E. **Prostaglandin D<sub>2</sub>, F<sub>2a</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>1</sub> in early phase of experimental acute necrohemorrhagic pancreatitis in rats.** *Pancreas* 1994; 9: 73-77.
177. Beger Z, Balint GA, Pap A, Karacsony G, Varro V. **Prostaglandin F2 alpha and prostacyclin tissue levels in early phases of trypsin-induced acute pancreatitis in rats.** *Pancreas* 1988; 4: 295-299.
178. Crockett KV, Brackett K, Crockett A, Jacobson ED, Rao SS, Joffe SN. **Prostaglandin E<sub>1</sub> treatment in experimental acute pancreatitis in the rat.** *European Surgical Research* 1984; 16: 265-273.
179. Hirano T, Manabe T, Tobe T. **Cytoprotective effects of prostaglandins and a new potent protease inhibitor in acute pancreatitis.** *American Journal of Medical Science* 1992; 304: 154-163.
180. Hotter G, León OS, Roselló-Catafau J, López-Boado MA, Puig-Parellada P, Henriques RD, Fernández-Cruz L, Gelpí E. **Tissular prostanoid release, phospholipase A2 activity, and lipid peroxidation in pancreas transplantation.** *Transplantation* 1991; 51: 987-990.
181. Closa D, Hotter G, Roselló-Catafau J. **Prostanoids and oxigen free radicals in early stages of experimental acute pancreatitis.** *Digestive Diseases and Sciences* 1994; 39: 1537-1543.
182. Welbourn CR, Young Y. **Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators.** *British Journal Surgery* 1992; 79: 998-1003.

183. Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD. **Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis.** *Gut* 2001; 48: 62-69.
184. Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC. **Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade.** *Annals of Surgery* 1995; 221: 625-631.
185. Curley P, Nestor M, Collins K, Saporoschetz I, Mendez M, Mannick JA, Rodrick ML. **Decreased interleukin-2 production in murine acute pancreatitis: potential for immunomodulation.** *Gastroenterology* 1996; 110: 583-588.
186. Messmann H, Vogt W, Falk W, Vogl D, Zirngibl H, Leser HG, Scholmerich J. **Interleukins and their antagonists but not TNF and its receptors are released in post-ERP pancreatitis.** *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1998; 10: 611-617.
187. Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ. **Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis.** *British Journal of Surgery* 1995; 82: 1414-1420.
188. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. **Interleukin-8 (IL-8): The major neutrophil chemotactic factor in the lung.** *Experimental Lung Research* 1991; 17: 17-23.
189. Van Laethem JL, Eskinazi R, Louis H, Rickaert F, Robberecht P, Devière J. **Multisystemic production of interleukin 10 limits the severity of acute pancreatitis in mice.** *Gut* 1998; 43: 408-413.
190. Van Laethem JL, Marchant A, Delvaux A, Goldman M, Robberecht P, Velu T, Devière J. **Interleukine 10 prevents necrosis in murine**

- experimental acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 1995; 108: 1917-1922.
191. Simovic MO, Bonham MJ, Abu-Zidan FM, Windsor JA. **Anti-inflammatory cytokine response and clinical outcome in acute pancreatitis.** *Critical Care Medicine* 1999; 27: 2662-2665.
192. Zou WG, Wang DS, Lang MF, Jin DY, Xu DH, Zheng ZC, Wu ZH, Liu XY. **Human interleukin 10 gene therapy decreases the severity and mortality of lethal pancreatitis in rats.** *Journal of Surgical Research* 2002; 103: 121-126.
193. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 1975; 72: 3666-3670.
194. De Beaux AC, Fearon KC. **Circulating endotoxin, tumour necrosis factor-alpha, and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis.** *Scandiavian Journal of Gastroenterology* 1996; 219: 43-46.
195. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremmer KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB. **Soluble tumor necrosis factor receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists.** *Journal of Immunology* 1993; 151: 1548-1561.
196. Folch E, Serrano A, Sabater L, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Closa D. **Soluble receptors released during acute pancreatitis interfere with the detection of tumor necrosis factor alpha.** *Critical Care Medicine* 2001; 29: 1023-1026.
197. Anderson BO, Bensard DB, Harken AH. **The role of platelet-activating factor and its antagonists in shock, sepsis and multiple organ failure.** *Surgery Gynecology and Obstetrics* 1991; 172: 415-424.

198. Jaworek J, Konturek SJ. **Effects of prostaglandins (PG) of E, F and I series leukotrienes (LT) and platelet-activating factor on amylase release from isolated pancreatic acini (abstract).** *Digestion* 1992; 52: 92.
199. Chen C-C, Wang S-S, Lee F-Y, Chang F-Y, Lee S-D. **Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis.** *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94: 213-218.
200. Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SL, Ward PA. **Anti-tumor necrosis factor antibody augments edema formation in caerulein-induced acute pancreatitis.** *Journal of Surgical Research* 1991; 51: 495-499.
201. Grewal HP, Garland L, Novak K, Gaber L, Tolley EA, Gaber AO. **Risk factors for postimplantation pancreatitis and pancreatic thrombosis in pancreas transplant recipients.** *Transplantation* 1993; 56: 609-612.
202. Norman JG, Franz MG, Fink GW. **Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis.** *Surgery* 1996; 120: 515-521.
203. Norman J. **The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis.** *American Journal of Surgery* 1998; 175: 76-83.
204. Zhao X, Andersson R, Wang X, Dib M, Wang X. **Acute pancreatitis-associated lung injury: pathophysiological mechanisms and potential future therapies.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2002; 12: 1351-1358.
205. Finn Morgan M, Warrens AN. **Determining compatibility of adhesion molecules.** *Graft* 2001; 4: 40-43.
206. Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicut S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber O. **Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis.** *Annals of Surgery* 2000; 233: 213-220.

- 
207. Rau B, Pazkowsky A, Esber S, Gansauge F, Poch B, Beger HG, Möller P. **Anti-ICAM-1 antibody modulates late onset of acinar cell apoptosis and early necrosis in taurocholate-induced experimental acute pancreatitis.** *Pancreas* 2001; 23: 80-88.
208. Altavilla D, Squadrito F, Canale P. **Tumor necrosis factor induced E-selectin production in splanchnic artery occlusion shock.** *American Journal of Physiology* 1995:H1412.
209. Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Guillooly KM, Shuster D J, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Terry RW, Harbison ML. **Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins.** *Immunity* 1994; 1: 709-720.
210. Donnelly SC, Haslett C, Dransfield I, Robertson CE, Carter DC, Ross JA, Grant IS. **Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome.** *Lancet* 1994; 344: 215-219.
211. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** *Nature* 1987; 327: 524-526.
212. Moncada S, Higgs EA. **Endogenous nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology.** *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 109-142.
213. Kuo PC, Schroeder RA. **The emerging multifaceted roles of nitric oxide.** *Annals of Surgery* 1995; 221: 220-235.
214. Anggard EE. **Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine.** *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
215. Leindler L, Morschl E, László F, Mándi Y, Takács T, Jármay K, Farkas G. **Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the**
-

- pathological process of necrotizing pancreatitis in rats.** *Pancreas* 2004; 29: 157-161.
216. Werner J, Rivera J, Fernández del Castillo C, Lewandrowski KB, Adrie C, Rattner DW, Warshaw AL. **Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis.** *Surgery* 1997; 121: 23-30.
217. Gaboury J, Woodman RC, Granger N, Reinhardt P, Kubes P. **Nitric oxide prevents leukocyte adherence: Role of superoxide.** *American Journal of Physiology* 1993; 34: H862-H867.
218. Lomis TJ, Siffring CW, Chalasani S, Ziegler DW, Lentz KE, Stauffer KE. **Nitric oxide synthase inhibitors N-monomethylarginine and aminoguanidine prevent the progressive and severe hypotension associated with a rat model of pancreatitis.** *American Surgeon* 1995; 61: 7-10.
219. Linquist S, Craig EA. **The heat shock proteins.** *Annual Review of Genetics* 1988; 22: 631-677.
220. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. **Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp 70 antibodies in the serum of normal individuals.** *Immunological Investigations* 1998; 27: 367-377.
221. Folch E, Closa D, Ñeco P, Solé S, Planas A, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Pancreatitis induces HSP72 in the lung: role of neutrophils and xantine oxidase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 273: 1078-1083.
222. Santoro MG. **Heat shock factors and the control of the stress response.** *Biochemical Pharmacology* 2000; 59:55-63.
223. Febbraio MA, Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Hiscock N, Pedersen BK. **IL-6 activates HSP72 gene expresion in human skeletal muscle.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296: 1264-1266.

224. Masubuchi Y, Bourdi M, Reilly TP, Graf MLM, George JW, Pohl LR. **Role of interleukine-6 in hepatic heat shock protein expression and protection against acetaminophen-induced liver disease.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 304: 207-212.
225. Shibata S, Asanuma Y, Itoh H, Koyama K. **The circadian rhythm of HSP 60 in pancreas of rat.** *Pancreas* 1998; 17: 316-318.
226. Fujino Y, Suzuky Y, Tsujimura T, Takahashy T, Tanioka Y, Tominaga M, Ku Y, Kuroda Y. **Possible role of heat shock protein 60 in reducing ischemic-reperfusion injury in canine pancreas after preservation by the two-layer method.** *Pancreas* 2001; 23: 393-398.
227. Bhagat L, Singh VP, Hietaranta AJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. **Heat shock protein 70 prevents secretagoge-induced cell injury in the pancreas by preventing intracellular trypsinogen activation.** *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 81-89.
228. Klein SD, Brüne B. **Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apaptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release.** *Biochemical Journal* 2002; 362:635-641.
229. Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. **Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular Chondrocytes.** *Arthritis and Rheumatism* 2003; 48: 1562-1568.
230. Rakonczay ZJ, Takács T, Boros I, Lonovics J. **Heat shock proteins and the pancreas.** *Journal of Cell Physiology* 2003; 195: 383-391.
231. Ripley BJM, Isenberg DA, Latchman DS. **Elevated levels of the 90 kDa Heat shock protein (hsp90) in SLE correlate with levels of IL-6 and autoantibodies to hsp90.** *Journal of Autoimmunity* 2001; 17: 341-346.
232. Planas MA, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martin F, Ferrer I. **The heat shock stress response after brain lesions: Induction of 72 kDa Heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional**

- regulation) and protein synthesis inhibition.** *Progress in Neurobiology* 1997; 51: 607-636.
- 233 Bhagat L, Singh VP, Song AM, Van Acker GJD, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. **Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats.** *Gastroenterology* 2002; 122: 156-165.
234. Grise K, Kim F, McFadden D. **Hyperthermia induces heat-shock protein expression, reduces pancreatic injury and improves survival in necrotizing pancreatitis.** *Pancreas* 2000; 21: 120-125.
235. Delhaye M, Demols A, Van Laethem JL, Remmelink M, Degraef C, Galand P, Le Moine O, Deviere J. **Heat shock protein expression in the pancreas, liver and lung during experimental acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 2000; Part I 118: 3297.
236. Villar J, Edelson JD, Post M, Brendan J, Mullen M, Slutsky AS. **Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury.** *American Review of Respiratory Diseases* 1993; 147: 177-181.
- 237 Moynihan B. **Acute pancreatitis.** *Annals of Surgery* 1925; 81.
238. Wilson C, Imrie CW. **Systemic effects of acute pancreatitis.** En: C. D. Johnson, C. W. Imrie, eds. *Pancreatic disease. Progress and prospects.* London: Springer-Verlag, 1991:287-297.
239. Warshaw AL, Lesser PB, Rie M, Cullen DJ. **The pathogenesis of pulmonary edema in acute pancreatitis.** *Annals of Surgery* 1975; 182: 505-510.
- 240 Lankisch PG, Rahlf G, Koop H. **Pulmonary complications in fatal acute hemorrhagic pancreatitis.** *Digestive Diseases and Sciences* 1983; 28: 110-116.

241. Willemer S, Feddersen CO, Karges W, Adler G. **Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. I. Morphological studies.** *International Journal of Pancreatology* 1991; 8: 305-321.
242. Guice KS, Oldham KT, Johnson KJ, Kunkel RG, Morganroth ML, Ward PA. **Pancreatitis-induced acute lung injury. An ARDS model.** *Annals of Surgery* 1988; 208: 71-77.
243. Berry AR, Taylor TV. **Effects of drugs on the pulmonary changes in experimental acute pancreatitis in the rat.** *Gut* 1982; 23: 481-484.
244. Milani RJ, Pereira PM, Dolhnikoff M, Saldiva PH, Martins MA. **Respiratory mechanics and lung morphometry in severe pancreatitis-associated acute lung injury in rats.** *Critical Care Medicine* 1995; 23: 1882-1889.
245. Folch E, García-Montero A, Iovanna J, Dagom JC, Prats N, Vaccaro MI, Closa D. **The pancreatitis-associated protein induces lung inflammation in the rat through activation of TNF-alpha expression in hepatocytes.** *Journal of Pathology* 2003; 199: 398-408.
246. Goris RJA. **Mediators of multiple organ failure.** *Intensive Care Medicine* 1990; 16: S192-S196.
247. Tahamont MV, Barie PS, Blumenstock FA, Hussain MH, Malik AB. **Increased lung vascular permeability after pancreatitis and trypsin infusion.** *American Journal of Pathology* 1982; 109: 15-26.
248. Guice KS, Oldham KT, Wolfe RR, Simon RH. **Lung injury in acute pancreatitis: Primary inhibition of pulmonary phospholipid synthesis.** *American Journal of Surgery* 1987; 153: 54-61.
249. Das SK, Scott MT, McCuiston S. **Effects of experimental acute pancreatitis in dogs on metabolism of lung surfactant phosphatidylcholine.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1987; 145: 612-618.

250. Edelson JD, Vadas P, Villar J, Mullen M, Pruzanski W. **Acute lung injury induced by phospholipase A<sub>2</sub>. Structural and functional changes.** *American Review of Respiratory Diseases* 1991; 143: 1102-1109.
251. Büchler M, Malfertheiner P, Schädlich H, Nevalainen TJ, Friess H, Beger HG. **Role of phospholipase A<sub>2</sub> in human acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 1989; 97: 1521-1526.
252. Bardají M. **Importancia de la sangre venosa portal en la inducción de las complicaciones sistémicas de la pancreatitis aguda experimental.** Tesis doctoral. Departamento de Cirugía y Especialidades Quirúrgicas. Barcelona: Universidad de Barcelona, 1995:193-210.
253. Lightner AM, Jordan TH, Bunnett NW, Grady EF, Kirkwood KS. **Recombinant human neutral endopeptidase ameliorates pancreatic elastase-induced lung injury.** *Surgery* 2002; 132: 193-199.
254. Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, Murakami H, Itoh K, Itoh T, Harada A, Nonami T, Takag H. **Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis.** *Archives of Surgery* 1995; 130: 93-98.
255. Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver.** *Annals of Surgery* 1999; 229: 230-236.
256. Bemey T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, Vermeulen B, Morel P. **Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis.** *Pancreas* 1999; 18: 371-377.
257. O'Donovan DA, Kelly CJ, Abdih H, Bouchier-Hayes D, Watson RW, Redmond HP, Burke PE, Bouchier-Hayes DA. **Role of nitric oxide in lung injury associated with experimental acute pancreatitis.** *British Journal Surgery* 1995; 82: 1122-1126.

258. Tsukahara Y, Horita Y, Anan K, Morisaki T, Tanaka M, Torisu M. **Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis.** *Journal of Surgical Research* 1996; 66: 43-50.
259. Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. **The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis-associated lung injury.** *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701.
260. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. **The role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis.** *Annals of Surgery* 1984; 200: 405-412.
261. Granell S, Serrano-Mollar A, Folch E, Navajas D, Farre R, Bulbena O, Closa D. **Oxygen in the alveolar air space mediates lung inflammation in acute pancreatitis.** *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37: 1640-1647.
262. Keim V, Rohr G, Stöckert HG, Haberich FJ. **An additional secretory protein in the rat pancreas.** *Digestion* 1984; 29: 242-249.
263. Fiedler F, Croissant N, Rehbein C, Iovanna JL, Dagom JC, van Ackern K, Keim V. **Acute phase response of the rat pancreas protects against further aggression with severe necrotizing pancreatitis.** *Critical Care Medicine* 1998; 26:887-894.
264. Demols A, Le Moine O, Desalle F, Quertinmont E, Van Laethem JL, Deviere J. **CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice.** *Gastroenterology* 2000; 118: 582-590.
265. Jurkowska G, Dlugosz J, Gabryelewicz A, Andrejewska A. **The time course of liver DNA and RNA alterations in acute experimental pancreatitis in rats - A possible mechanism of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) protection.** *Hepato-Gastroenterology* 1989; 36: 249-254.
266. Dlugosz J, Pawlicka E, Gabryelewicz A. **Lysosomal-mitochondrial interrelationships in damage to the liver in acute experimental**

- pancreatitis in dogs. Treatment with prostacyclin (PGI<sub>2</sub>).** *International Journal of Pancreatology* 1988; 3: 343-356.
267. Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, Gaber AO. **Induction of tumor necrosis factor in acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage.** *Surgery* 1994; 115: 213-221.
268. Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. **Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate in vivo.** *Journal of Immunology* 1985; 135: 3972-3977.
269. Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ. **Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1980; 15: 411-416.
270. Aho HJ, Souompä K, Ahola RA, Nevalainen TJ. **Experimental pancreatitis in the rat. Ductal factors in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis.** *Experimental Pathology* 1984; 25: 73-77.
271. Takiyama Y, Takebe T, Ohyama K. **Acute necrotizing pancreatitis caused by the injection of lysolecithin into the pancreatic duct in the rat. Its natural course and effect of drugs on rate of survival.** *Hokkaido Igaku Zasshi* 1984; 59: 166-175.
272. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. **Relationship between severity, necrosis and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis.** *American Journal of Physiology* 1995; 269: C1295-C1304.
273. Wilson C, Imrie W. **Experimental models of acute pancreatitis.** En: Johnson J. D. & Imrie CW, ed. *Pancreatic disease*. Vol. 227-235. Dapler, 1987.

- 
274. Abe R, Shimosegawa T, Kimura K, Abe T, Kashimura J, Koizumi M, Toyota T. **The role of endogenous glucocorticoids in rat experimental models of acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 1995; 109: 933-943.
275. Niederau C, Luthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD. **Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Methodology and standards.** *European Journal of Surgical Research* 1992; 24: 40-54.
276. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. **A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy.** *Annals of Surgery* 1992; 215: 44-56.
277. Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C. **Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy.** *British Journal of Surgery* 1990; 77: 1205-1210.
278. Spormann H, Sokolowski A, Letko G. **Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat.** *Pathology Research and Practice* 1989; 184: 507-513.
279. Obermaier R, Benz S, Kortmann B, Benthues A, Ansorge N, Hopt UT. **Ischemia/reperfusion-induced pancreatitis in rats: a new model of complete normothermic in situ ischemia of a pancreatic tail-segment.** *Clinical and Experimental Medicine* 2001; 1: 51-59.
280. Grace PA. **Ischaemia-reperfusion injury.** *British Journal of Surgery* 1994; 81: 637-647.
281. Sorkine P, Setton A, Halpern P, Miller A, Rudick V, Marmor S, Klausner JM, Goldman G. **Soluble tumor necrosis factor receptors reduce bowel ischemia-induced lung permeability and neutrophil sequestration.** *Critical Care Medicine* 1995; 23: 1377-1381.
282. Gaines GC, Burrell Welborn III M, Moldawer LL, Huber TS, Harward TRS, Seeger JS. **Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion**
-

- injury by inhibition of tumor necrosis factor.** *Journal of Vascular Surgery* 1999; 29: 370-376.
283. Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergün H, Gürhan I. **Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion.** *British Journal of Surgery* 2001; 88: 464-468.
284. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Ferlito M, Campo GM, Arlotta M, Grimaldi S, Quartarone C, Saitta A, Caputi AP. **Tacrolimus suppresses tumor necrosis factor-alpha and protects against splanchnic artery occlusion shock.** *British Journal of Pharmacology* 1999; 127: 498-504.
285. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. **Tumor necrosis factor up-regulates intracellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat.** *Shock* 1998; 10: 182-191.
286. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. **Requirements for tumor necrosis factor-a and interleukin-1 in limb ischemia-reperfusion and associated lung injury.** *American Journal of Pathology* 1993; 143: 453-463.
287. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL. **Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury.** *American Journal of Physiology* 1989; 256: H315-H319.
288. Carden DL, Granger DN. **Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.** *Journal of Pathology* 2000; 190: 255-266.
289. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. **The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat.** *Hepatology* 1996; 23: 506-514.
290. Benz S, Schnabel R, Weber H, Pfeffer F, Wiesner R, von Breitenbuch P, Nizze H, Schareck W, Hopt UT. **The nitric oxide donor sodium**

- nitroprusside is protective in ischemia-reperfusion injury of the pancreas.** *Transplantation* 1998; 66: 994-999.
291. Tanaka S, Kamiike W, Kosaka H, Ito T, Kumura E, Shiga T, Matsuda H. **Detection of nitric oxide production and its role in pancreatic ischemia-reperfusion in rats.** *American Journal of Physiology* 1996; 271: G405-G409.
292. Hotter G, Closa D, Pí F, Prats N, Fernández-Cruz L, Balbuena O, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Nitric oxide and arachidonate metabolism in ischemia-reperfusion associated with pancreas transplantation.** *Transplantation* 1995; 59: 417-421.
293. Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RC, Mathie RT. **Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion.** *British Journal of Surgery* 2001; 88: 1189-1193.
294. Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. **Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats.** *Digestive Diseases and Sciences* 1996; 41: 823-830.
295. Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG. **Ischemia/reperfusion-induced pancreatitis.** *Digestive Surgery* 2000; 17: 3-14.
296. Benz S, Wiessner R, Obermaier R, Pfeffer F, Hopt UT. **Microcirculatory events in ischemia/reperfusion of the pancreas defined by continuous tissue oximetry.** *Transplant International* 2002; 15: 173-179.
297. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Le J, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M. **Ischemia-reperfusion injury on cell pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis.** *Journal of Surgical Research* 1997; 71: 127-136.

298. Hoffmann TF, Leiderer R, Harris AG, Messmer K. **Ischemia and reperfusion in pancreas.** *Microscopy Research and Technique* 1997; 37: 557-571.
299. Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. **Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation.** *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104: 541-549.
300. Hartmann A. **Antiapoptotic agents in brain ischemia.** *New England Journal of Medicine* 2000; 342: 823.
301. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury by hepatic ischemia-reperfusion in the rat.** *Hepatology* 1999; 30: 1481-1489.
302. Gullo L, Cavichi L, Tomasetti P, Spagnolo C, Freyrie A, D'Addato M. **Effects of ischemia on the human pancreas.** *Gastroenterology* 1996; 111: 1033-1038.
303. Knoefel WT, Kollias N, Warshaw AL, Waldner H, Nishioka NS, Rattner DW. **Pancreatic microcirculatory changes in experimental pancreatitis of graded severity in the rat.** *Surgery* 1994; 116: 904-913.
304. Tamura K, Manabe T, Kyogoku T, Andoh K, Ohshio G, Tobe T. **Effect of postischemic reperfusion on the pancreas.** *Hepatogastroenterology* 1993; 40: 452-456.
305. Viola G, al-Mufti RA, Sohail M, Williamson RC, Mathie RT. **Nitric oxide induction in a rat model of selective pancreatic ischemia and reperfusion.** *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1250-1255.
306. Waldner H. **Vascular mechanisms to induce acute pancreatitis.** *European Surgical Research* 1992; 24: 62-67.
307. Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH. **Arterial constriction, ischaemia-reperfusion and leukocyte**

- adherence in acute pancreatitis.** *American Journal of Physiology* 1993; 265: G165-G171.
308. Toyama MT, Lewis MP, Kusske AM, Reber PU, Ashley SW, Reber HA. **Ischaemia-reperfusion mechanisms in acute pancreatitis.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Suppl* 1996; 219: 20-23.
309. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Tomaszewska R, Dembinski M, Pabianczyk M, Stachura J, Konturek SJ. **Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis.** *European Journal of Pharmacology* 2003; 473: 207-216.
310. Busing M, Hopt UT, Quacken M, Becker HD, Morgenroth K. **Morphological studies of graft pancreatitis following pancreas transplantation.** *British Journal of Surgery* 1993; 80: 1170-1173.
311. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Stachura J, Tomaszewska R, Konturek SJ, Sendur R, Dembinski M, Pawlik WW. **Pancreatic damage and regeneration in the course of ischemia-reperfusion induced pancreatitis in rats.** *Journal of Physiology and Pharmacology* 2001; 52: 221-235.
312. Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K. **Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats.** *Research in Experimental Medicine* 1995; 195: 125-144.
313. Tomaszewska R, Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Konturek SJ, Stachura J. **The influence of epidermal growth factor on the course of ischemia-reperfusion induced pancreatitis in rats.** *Journal of Physiology and Pharmacology* 2002; 53: 183-198.
314. Lee S, Tung KS, Koopmans H, Chandler JG, Orloff MJ. **Pancreaticoduodenal transplantation in the rat.** *Transplantation* 1971; 22: 545-546.

315. Schang T, Timmermann W, Thiede A. **Various techniques of experimental pancreas transplantation in the rat.** En: Thiede A, Deltz E, Engemann R, Hamelmann H, eds. *Microsurgical models in rats for transplantation research.* Berlín: Springer-Verlag, 1985:57-64.
316. Elian N, Carnot F, Bailbé D, Cugnenc PH, Altman JJ. **Total pancreaticoduodenal transplation with portal venous drainage: Metabolic assessments in diabetic rats.** *European Surgical Research 2000; 32: 120-124.*
317. Schaser KD, Puhl G, Vollmar B, Menger MD, Kohler K, Neuhaus P, Settmacher U. **In vivo imaging of human pancreatic microcirculation and pancreatic tissue injury in clinical pancreas transplantation.** *American Journal of Transplantation 2005; 5: 341-350.*
318. Benz S, Bergt S, Obermaier R, Wiessner R, Pfeffer F, Schareck W, Hopt UT. **Impairment of microcirculation in the early reperfusion period predicts the degree of graft pancreatitis in clinical pancreas transplantation.** *Transplantation 2001; 71: 759-763.*
319. Obermaier R, von Dobschuetz E, Drognitz O, Hopt UT, Benz S. **Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow and leukocyte adherence in postischemic pancreatitis.** *Langenbecks Archives of Surgery 2004; 389: 511-516.*
320. Johnson BF, Thomas G, Wiley KN, Greaves M, Preston FE, Fox M, Raftery AT. **Thromboxane and prostacyclin synthesis in experimental pancreas transplantation. Changes in parenchymal and vascular prostanoids.** *Transplantation 1993; 56: 1447-1453.*
321. Pí F, Hotter G, Closa D, Roselló-Catafau J, Bulbena O, Badosa F, Morris M, Fernández-Cruz L, Gelpí, E. **Effect of platelet-activating factor antagonist and deferoxamine administration on eicosanoid production in rat pancreas transplantation.** *Transplantation 1994; 57: 12-17.*

322. Wang FS, Yamaguchi Y, Akizuki E, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M, Mori K, Yamada S, Ogawa M. **Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) decreases cytokine-induced neutrophil chemoattractant after reperfusion of pancreaticoduodenal transplantation in rats.** *Transplantation* 1996; 61: 1103-1107.
323. Mayer H, Schmidt J, Thies F, Ryschich E, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. **Characterization and reduction of ischemia-reperfusion injury after experimental pancreas transplantation.** *Journal of Gastrointestinal Surgery* 1999; 3: 162-166.
324. Witzigmann H, Ludwig E, Armann B, Gäbel G, Teupser D, Kratzsch J, Pietsch UC, Tannapfel A, Geissler F, Hauss J, Uhlmann D. **Endothelin A receptor blockade reduces ischemia/reperfusion injury in pig pancreas transplantation.** *Annals of Surgery* 2003; 238: 264-274.
325. Hotter G, Pi F, Sanz C, Peralta C, Prats N, Gelpi E, Badosa F, Fernández-Cruz L, Rosello-Catafau J. **Endothelin mediated nitric oxide effects in ischemia--reperfusion associated with pancreas transplantation.** *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43: 2627-2633.
326. Pí F, Hotter G, Closa D, Prats N, Fernández-Cruz L, Badosa F, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Differential effect of nitric oxide inhibition as a function of preservation period in pancreas transplantation.** *Digestive Diseases and Sciences* 1997; 42: 962-971.
327. Vollmar B, Janata J, Yamuchi JI, Menge D. **Attenuation of microvascular reperfusion injury in rat pancreas transplantation by L-arginine.** *Transplantation* 1999; 67: 950-955.
328. Yuan CH, Liu YF, Cheng Y, Zhao N, Li GC, Liang J, He SG. **Protective effects of L-arginine on reperfusion injury after pancreaticoduodenal transplantation in rats.** *Hepatobiliary and Pancreatic Disease International* 2004; 3: 349-354.
329. Keck T, Werner J, Schneider L, Gebhard MM, Klar E. **Characterization of ischemia/reperfusion injury after pancreas transplantation and**

- reduction by application of monoclonal antibodies against ICAM-1 in the rat.** *Surgery* 2003; 134: 63-71.
330. Knoop M, McMahon RF, Braganza JM, Hutchinson IV. **Acute pancreatitis after experimental pancreatic transplantation.** *American Journal of Surgery* 1989; 158: 452-8.
331. Drognitz O, Liu X, Benz S, Obermaier R, Herb T, Schareck W, Hopt UT. **Ischemia/reperfusion injury induces acinar cell apoptosis in experimental pancreas transplantation.** *Transplantation Proceedings* 2002; 34: 2361.
332. Boonstra JG, Weber PC, Laterveer JC, Brujin JA, van der Woude FJ, ten Berge IJ, Daha MR. **Apoptosis of acinar cells in pancreas allograft rejection.** *Transplantation* 1997; 64: 1211-1213.
333. Steinberg W, Tenner S. **Acute pancreatitis.** *New England Journal of Medicine* 1994; 330: 1198-1210.
334. Folch E, Closa D, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Leukotriene generation and neutrophil infiltration after experimental acute pancreatitis.** *Inflammation* 1998; 22: 83-93.
335. Stork G. **Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical study in the rat.** *Acta Chirurgica Scandinava* 1971; 47(Suppl.): 1-36.
336. Fernández-Cruz L, Targarona EM, Astudillo E, Prieto M, Colomer J. **Trasplante pancreático-duodenal y de páncreas con el conducto ligado.** *Trasplante de órganos y tejidos.* Barcelona: Ediciones Doyma, 1987:262-270.
337. Armitage P. **Statistical methods in medical research.** 3rd ed. New York: Blackwell Scientific Publications. 1995:92.
338. Fleiss JL. **Statistical Methods for Rates and Proportions.** New York: John Wiley & sons Ed. 1981.

- 
339. Wilson C, Imrie CW. **Experimental models of acute pancreatitis.** En: Johnson C. D. & Imrie CW, eds. Pancreatic disease. Progress and prospects. London: Springer - Verlag, 1991:227-239.
340. Rowe GT, Eaton LR, Hess ML. **Neutrophil-derived, oxygen free radical-mediated cardiovascular dysfunction.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1984; 16: 1075-1079.
341. Wahlberg J, Southard JH, Belzer FO. **Preservation-induced pancreatitis in an isolated perfused pancreas model in the dog.** *Transplant International* 1989; 2: 165-167.
342. Drognitz O, Von Dobschuetz E, Kissler H, Liu X, Obermaier R, Neeff H, Hopt UT, Benz S. **Organ procurement in experimental pancreas transplantation with minimal microcirculatory impairment.** *European Surgical Research* 2004; 36: 185-1891.
343. Trush MA, Egner PA, Kensler TW. **Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation.** *Food and Chemical Toxicology* 1994; 32: 143-147.
344. Gloor B, Todd KE, Lane JS, Lewis MP, Reber HA. **Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice.** *Journal of Gastrointestinal Surgery* 1998; 2: 430-435.
345. Pí F, Badosa F, Sola A, Roselló-Catafau J, Xaus C, Prats N, Gelpí E, Hotter G. **Effects of adenosine on ischemia-reperfusion injury associated with rat pancreas transplantation.** *British Journal of Surgery* 2001; 88: 1366-1375.
346. Bathe OF, Chow AW, Phang PT. **Splanchnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion.** *Surgery* 1998; 123: 79-88.

347. Norman J, Fink GW, Carter G, Rosemurgy A, Franz M. **Multiple organ cytokine gene expression induced by acute pancreatitis (abstract).** *Gastroenterology* 1995; 108: 1235.
348. Kaufmann P, Tilz GP, Lueger A, Demel U. **Elevated plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFRp60) reflect severity of acute pancreatitis.** *Intensive Care Medicine.* 1997; 23: 841-848.

---

## Índice de tablas

TABLA 1. SUBSTANCIAS ESTIMULANTES E INHIBIDORAS DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA.....	11
TABLA 2. CAUSAS DE PANCREATITIS AGUDA Y SU MECANISMO DE ACCIÓN.....	16
TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA RT-PCR.....	182
TABLA 4. VALORES MEDIOS DE LIPASA PLASMÁTICA $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN UNIDADES/LITRO PARA TODOS LOS GRUPOS.....	186
TABLA 5. VALORES MEDIOS DE MPO PANCREÁTICA $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN MU/MG DE PROTEINA EN TODOS LOS GRUPOS.....	188
TABLA 6. VALORES MEDIOS DE MIELOPEROXIDASA EN PULMÓN $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN MU/MG PROTEINA PARA TODOS LOS GRUPOS A ESTUDIO.....	190
TABLA 7. VALORES PLASMÁTICOS MEDIOS DE Rs1-TNFa $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA A NIVEL DE VENA CAVA INFERIOR Y VENA SUPRAHEPÁTICA EN PG / ML PARA LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS Y TRASPLANTE .	191
TABLA 8. VALORES PLASMÁTICOS MEDIOS DE Rs2TNFa $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN PG/ML PARA LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS Y TRASPLANTE. C= VENA CAVA INFERIOR, S= VENA SUPRAHEPÁTICA.....	193
TABLA 9. VALORES PLASMÁTICOS MEDIOS DE Rs1-TNFa $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA A NIVEL DE SANGRE PERIFÉRICA (VENA CAVA INFERIOR) EN PG/ML PARA LOS GRUPOS CONTROL , PANCREATITIS, TRASPLANTE Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN ÓRGANO NATIVO O INJERTO.....	201
TABLA 10. VALORES PLASMÁTICOS MEDIOS DE Rs2TNFa $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN PG/ML EN SANGRE PERIFÉRICA PARA LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS, TRASPLANTE, TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL ÓRGANO NATIVO Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO.....	202



## Índice de figuras

FIGURA 1. SÍNTESIS Y LIBERACIÓN CELULAR DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y LISOSOMALES.....	10
FIGURA 2. INTERRELACIÓN DE LAS ENZIMAS DE SECRECIÓN PANCREÁTICA.....	13
FIGURA 3. EVOLUCIÓN DE LAS COMPLICACIONES DE LA PANCREATITIS AGUDA..	23
FIGURA 4. SÍNTESIS Y LIBERACIÓN ENZIMÁTICA EN CONDICIONES NORMALES Y DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA.....	26
FIGURA 5. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN LA PANCREATITIS AGUDA GRAVE.....	29
FIGURA 6. FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL SHOCK DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA. ....	32
FIGURA 7. CONDICIONES ASOCIADAS A LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA. ....	40
FIGURA 8. SECUENCIA DE EVENTOS EN EL FALLO MULTIORGÁNICO.....	41
FIGURA 9. PRODUCCIÓN DE MEDIADORES Y EFECTOS TRAS LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS. ....	45
FIGURA 10. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN Y ACCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS.....	51
FIGURA 11. FASES DE LA INTERACCIÓN ENTRE NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS ENDOTELIALES. ....	53
FIGURA 12. REDUCCIÓN TETRAVALENTE DEL OXÍGENO. ....	56
FIGURA 13. MECANISMOS DE GENERACIÓN DE RLO POR PARTE DE LOS FAGOCITOS. ....	60
FIGURA 14. SECUENCIA DE EVENTOS EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	61
FIGURA 15. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS RLO SOBRE EL ENDOTELIO PULMONAR MEDIANDO EL SECUESTRO DE NEUTRÓFILOS. ....	63
FIGURA 16. MECANISMO HIPOTÉTICO DE INICIACIÓN DE LA LESIÓN EN LA PANCREATITIS AGUDA. ....	65
FIGURA 17. ESQUEMA DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.....	68
FIGURA 18. MECANISMOS DE LESIÓN DE LA FOSFOLIPASA A <sub>2</sub> A NIVEL PULMONAR.....	77
FIGURA 19. ACCIÓN DE LAS CITOQUINAS ELAVORADAS POR LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO. ....	78

FIGURA 20. ACTIVIDAD DE CÉLULAS Y MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN LA PANCREATITIS AGUDA .....	103
FIGURA 21. SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	137
FIGURA 22. PAPEL DE LA CÉLULA ENDOTELIAL EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	138
FIGURA 23. FISIOPATOLOGÍA DE LA PANCREATITIS MEDIADA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	147
FIGURA 24. PROCEDIMIENTO ANESTÉSICO.....	160
FIGURA 25. LAPAROTOMÍA TRANSVERSA SUBCOSTAL.....	161
FIGURA 26. CANULACIÓN DEL CONDUCTO BILIOPANCREÁTICO A TRAVÉS DEL BORDE ANTIMESENTÉRICO DEL DUODENO.....	162
FIGURA 27. OCLUSIÓN DEL CONDUCTO HEPÁTICO.....	163
FIGURA 28. ASPECTO DEL PÁNCREAS TRAS INFUSIÓN DE SAL SÓDICA DE ÁCIDO TAUCÓLICO AL 5%.....	163
FIGURA 29. DISECCIÓN Y EXÉRESIS DEL BAZO.....	164
FIGURA 30. EXPOSICIÓN DEL ESÓFAGO.....	165
FIGURA 31. DISECCIÓN DE ARTERIA Y CONDUCTO HEPÁTICOS.....	166
FIGURA 32. EXPOSICIÓN DE LA VENA PORTA.....	166
FIGURA 33. LIGADURA DE VASOS DE LA CURVATURA MAYOR Y EXTIRPACIÓN DEL ESTÓMAGO .....	167
FIGURA 34. EXPOSICIÓN DE ARTERIA RENAL DERECHA.....	167
FIGURA 35. SECCIÓN DE LA UNIÓN DUODENOYUNAL.....	168
FIGURA 36. DISECCIÓN DE LAS ARTERIAS LUMBARES.....	169
FIGURA 37. INDIVIDUALIZACIÓN SEGMENTO AÓRTICO CON APORTE VASCULAR AL PÁNCREAS.....	169
FIGURA 38. PERFUSIÓN DEL INJERTO.....	170
FIGURA 39. INJERTO DE DUODENO-PANCREAS, MOSTRANDO LA VENA PORTA.....	170
FIGURA 40. DISECCIÓN DE AORTA Y CAVA INFRARRENALES.....	171
FIGURA 41. OCLUSIÓN VASCULAR DE AORTA Y VENA CAVA INFERIOR.....	172
FIGURA 42. APERTURA LONGITUDINAL DE LA CAVA INFERIOR.....	172
FIGURA 43. ANASTOMOSIS TERMINO-LATERAL VENOSA DE LA PORTA DEL INJERTO CON LA CAVA DEL RECEPTOR.....	173
FIGURA 44. ANASTOMOSIS AORTO-AÓRTICA TERMINO-LATERAL.....	173
FIGURA 45. REPERFUSIÓN DEL INJERTO DUODENOPANCREÁTICO.....	174

FIGURA 46. NIVELES DE LIPASA SÉRICA EN GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS, SIMULACIÓN DE TRASPLANTE (ST, STP) Y TRASPLANTE .	186
FIGURA 47. VALORES DE MPO PANCREÁTICA EN MU/MG PROTEINA PARA LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS, SIMULACIÓN DE TRASPLANTE, SIMULACIÓN DE TRASPLANTE Y PANCREATITIS Y TRASPLANTE, TANTO PARA EL ÓRGANO NATIVO (Tn) COMO PARA EL INJERTO (Ti). .....	188
FIGURA 48. VALORES DE MPO PULMONAR EN LOS GRUPOS CONTROL (C), PANCREATITIS (P), SIMULACIÓN DE TRASPLANTE (ST), SIMULACIÓN DE TRASPLANTE CON PANCREATITIS(STP), Y TRASPLANTE(T).....	189
FIGURA 49. VALORES DE RS <sub>1</sub> -TNFA EN LOS GRUPOS CONTROL (C), PANCREATITIS (P) Y TRASPLANTE (T) PARA EXTRACCIONES SANGUÍNEAS A NIVEL DE VENA CAVA Y VENA SUPRAHEPÁTICA. ....	191
FIGURA 50. VALORES DE RS <sub>2</sub> -TNFA EN LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS Y TRASPLANTE PARA SUS MEDICIONES A NIVEL DE VENA CAVA Y VENA SUPRAHEPÁTICA.....	192
FIGURA 51. EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL MRNA DE TNFA, IL-6 Y HSP70 CON RESPECTO A LA PROTEINA CONTROL, EN LOS GRUPOS CONTROL , PANCREATITIS Y TRASPLANTE .....	194
FIGURA 52. HISTOLOGÍA PANCREÁTICA EN LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS Y TRASPLANTE. ....	195
FIGURA 53. HISTOLOGÍA PULMONAR EN LOS GRUPOS CONTROL, PANCREATITIS Y TRASPLANTE. ....	196
FIGURA 54. VALORES DE LIPASA SÉRICA EN U/L EN LOS GRUPOS PANCREATITIS Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO . ....	198
FIGURA 55. NIVELES DE MPO PANCREÁTICA EN EL GRUPO DE PANCREATITIS Y EN EL GRUPO DE TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO, TANTO EN ÓRGANO NATIVO (TPIIn) COMO EN EL INJERTO (TPII).....	199
FIGURA 56. VALORES DE MPO PULMONAR EN LOS GRUPOS PANCREATITIS Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO(TPI). ....	200
FIGURA 57. NIVELES DE RS <sub>1</sub> -TNFA EN LOS GRUPOS DE PANCREATITIS (P) Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO (TPI). ....	201
FIGURA 58. NIVELES DE RS <sub>2</sub> -TNFA EN LOS GRUPOS DE PANCREATITIS (P) Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO (TPI). ....	202

FIGURA 59. EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL mRNA DE TNFA, IL-6 Y HSP70 CON RESPECTO A LA PROTEINA CONTROL (ACTINA), EN LOS GRUPOS PANCREATITIS Y TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL INJERTO. ....	203
FIGURA 60. HISTOLOGÍA DEL INJERTO PANCREÁTICO TRAS ADMINISTRACIÓN INTRADUCTAL DE TAUROCOLATO SÓDICO. ....	204
FIGURA 61. HISTOLOGÍA PULMONAR TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE TAUROCOLATO SÓDICO SOBRE EL INJERTO PANCREÁTICO.....	205
FIGURA 62. NIVELES DE LIPASA PLASMÁTICA EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE, CON PANCREATITIS EN EL INJERTO Y EN EL NATIVO. ....	206
FIGURA 63. MIELOPEROXIDASA PANCREÁTICA EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE ASOCIADO A PANCREATITIS. (N: NATIVO; I: INJERTO).....	207
FIGURA 64. NIVELES DE MPO PULMONAR EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL ÓRGANO NATIVO Y EN EL INJERTO. ....	208
FIGURA 65. NIVELES DE RS <sub>1</sub> -TNFA EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE. ....	209
FIGURA 66. NIVELES DE RS <sub>2</sub> -TNFA EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE. ....	210
FIGURA 67. EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL mRNA DE TNFA, IL-6 Y HSP70 CON RESPECTO A LA PROTEINA CONTROL (ACTINA), EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN ÓRGANO NATIVO Y EN EL INJERTO. ...	211
FIGURA 68. TINCIONES CON HEMATOXILINA-EOSINA DE LOS PULMONES EN LOS GRUPOS DE TRASPLANTE CON PANCREATITIS EN EL ÓRGANO NATIVO (TPN) Y EN EL INJERTO (TPI).....	212