



Caracterització del tipus d'activació de diferents poblacions de macròfags durant la pancreatitis aguda experimental i la seva relació amb la severitat del procés

Sabrina Gea Sorli

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat de Biomedicina
Universitat de Barcelona

CARACTERITZACIÓ DEL TIPUS D'ACTIVACIÓ DE DIFERENTS POBLACIONS DE MACRÒFAGS DURANT LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL I LA SEVA RELACIÓ AMB LA SEVERITAT DEL PROCÉS.

Treball realitzat en els laboratoris del Institut
d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC).
Departament de Patologia experimental.

Memòria presentada per **Sabrina Gea Sorlí** per optar al
Títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

Director: Dr. Daniel Closa Autet

Juliol 2011



**La recerca ha de ser un joc,
perquè només jugant som feliços.**

Ramon Margalef

AGRAÏMENTS

Dani, gràcies per haver-me presentat l'apassionant món de la ciència. És increïble el que es pot aprendre al costat d'un *freaky*! Al teu costat he après des de tècniques de laboratori, a saber pensar, a saber fer preguntes i intentar contestar-les. A que tenir amics, col·legues, bona gent al teu costat és molt important. Que si les coses se volen se poden. He après a que si intentes fer les coses i ho fas amb confiança, estàs fent un pas endavant. Que equivocar-se és una part de l'aprenentatge i sobretot que treballar com a científica és molt divertit. Gràcies per contagiar-me amb la teva passió per la ciència. M'ha agradat molt treballar al teu costat. M'encanta com escoltes, dóna igual la barbaritat que et digui, mai jutges. Sempre tens temps per sentir noves idees, per fer una cervesa i parlar. És una sort per mi haver-te conegut.

Oriol, Tu em vas invitar a conèixer-vos. En certa manera, ets el responsable que jo estigui amb vosaltres i tot per la teva forma de ser. Un dia una amiga em va dir que coneixia a un científic amb molt bon caràcter, simpàtic i accessible, que podia ajudar-me si volia entrar en el món de la ciència, i aquí estic. És una sort per mi conèixer gent com tu. M'encanta com em cuides. Per les tardes mai m'ha faltat la teva companyia ni una xocolata per berenar. Gràcies per tot.

Per agrair tots els bons moments que he passat amb la gent del 710 necessitaria tants fulls... Me sento molt afortunada d'haver compartit tot aquest temps amb vosaltres. Tots, m'havau ensenyat a treballar bé, que he de confiar més en mi, que sempre hi ha un moment per donar o rebre una abraçada. Haveu estat ahí sempre. En els bons moments i en els no tan bons, per que al vostre costat no hi ha moments dolents. Haveu aguantat els meus nervis davant d'una exposició. Haveu estat al meu costat quan les coses no sortien i sempre que us he necessitat. M'havau ensenyat tècniques de laboratori, a parlar en públic, a fer presentacions. Sou genials!!!

Voldria agrair a Montse haver segut primer una companya i després una amiga. Per escoltar-me sempre que ho he necessitat. M'ha agradat molt compartir laboratori, grup, anar amb Tu de viatge, conèixer la teva família i els teus amics. Ha estat genial compartir tot aquest temps amb Tu, *solete*!! Un *besito* molt gros guapa.

A Neus i Emma, dir-les que m'ha agradat molt tenir-les al grup. Pel suport que m'heu donat al laboratori, de congrés, en els viatges. Hem passat molts bons moments

juntes. Estic molt contenta d'haver-vos conegut i espero que la nostra amistat continuï d'ara endavant. Ànims en tots els vostres projectes.

Quan vaig arribar al laboratori, Paty estava acabant i vam coincidir poc, igual que en Marieta. Però amb les dues he tingut temps de compartir confidències al laboratori, soparets, festa. Gràcies per estar ahi.

Al grup de *Respiratori*, al 710 menys la Sabrina, al grup d'Anna. A Anna, Nacho, Valeria, Raquel i Gemma. No tinc paraules per descriure com d'afortunada em sento d'haver estat tot aquest temps amb vosaltres. Sou tant *guapos*!!! M'havau aguantat tantes coses. Havau estat els meus companys, amics, família. M'ha encantat compartir amb tots vosaltres tot, i més coses que em queden. Sempre esteu ahi. Gràcies per ensenyar-me a ser millor científica, per animar-me en tot moment a tirar endavant, a donar la importància que toca a les coses, per escoltar-me i deixar-me parlar. Gràcies per ajudar-me en els meus experiments, per involucrar-vos en tot el que faig i deixar-me que m'emocioni amb tot allò que feu. Sabeu que valeu moltíssim? Segur que arribeu molt lluny. La pinya que feu és admirable i m'encanta quan m'incloeu en ella. M'agrada molt la sensació que tinc amb la vostra companyia. Hem viscut moments que mai oblidaré, celebracions, dinars, sopars, nits de festa, congressos viatges, calçotades. No em fa falta cridar-vos quan necessito ajuda. He après de vosaltres que després d'un dia dur és important acomiadar-se amb una cervesa amb olives. Mai us ha faltat un somriure per a mi. M'agrada molt quan us poseu contents amb les coses que vaig aconseguint, quan he publicat algun article, amb un bon resultat. M'ha agradat molt que m'acompanyéssiu al meu poble per falles, per festes, que passeu en mi el meu aniversari. Un petonet per a cadascú de vosaltres. Aaaiiiixxxx!!!

Hi ha tres persones molt especials per mi: Isabel, Rosa i Edu. Ells han segut els meus companys de pis. M'han ajudat molt. Han aguantat tot el meu entusiasme per la ciència, el meu cansament i els meus nervis. M'han ajudat a preparar les meves presentacions... I mira que no són d'aquest camp!! M'han donat suport en tot. És genial sentir la vostra alegria per tot el que faig, la vostra curiositat per la meva feina. Gràcies per tot, xiquets! Sou molt importants per mi, sou uns dels meus millors amics i tinc molta sort de tenir-vos a prop. Gràcies per la vostra paciència, per haver-me cuidat tant. A partir d'ara, que cadascú està tirant endavant en diferents ciutats, us trobaré a faltar.

A la gent del despatx 706. Primer Michaela, Anna i Amine, després Isa i Mary, ara Carlos. Permeteu que també inclogui en aquest grup a Joan Rosselló, el nostre veí del 704, per la quantitat d'hores que passa amb nosaltres. Sapieu que us aprecio molt, m'heu ensenyat moltes coses i heu estat sempre molt pendents de mi, amb els meus contractes, com em van les coses al laboratori, com duc la tesi. Gràcies pels vostres ànims.

Gràcies a Amine per haver-me invitat a conèixer el teu país, la teva cultura, la teva família i amics. Aquell va ser un viatge molt especial per mi. Allà vaig conèixer millor a Emma, Susagna, Isa, Anna, Nuria, Beth, Rosa, algunes de les seves parelles i a Joan. Éreu companys i amics i em va agradar molt que compartiu la vostra amistat amb mi.

Gràcies al grup de la Gina. Al 710 us hem sentit sempre molt a prop. Sou amb els que més coses hem compartit, hem anat de calçotada junts, de congres, de festa...però sobretot valoro la vostra amistat.

A la resta de grups de la setena, gràcies a la Carmen Garcia i la seva gent, sempre heu estat ahi amb tot i per tot. Gràcies al 711, la Joana, Petar, Natalia, Nuria, Kevin, Luis, a tots per la vostra simpatia i amabilitat, per escoltar-me i apoyar-me tant amb tot el que he fet.

A la gent de la sisena, per compartit amb mi un cafè pels matins, per sempre ser benvinguda als vostres laboratoris, per estar disposats a ensenyar-me diferents tècniques, com funcionen els aparells. M'ha agradat molt estar amb vosaltres tot aquest temps. Hem compartit molts de moments: sopars, nits de festa, una barca en la transegre, moments en els passillos. M'agradaria posar noms, però segur em deixo a algú i no voldria. Tot i això, hi ha certes persones que han posat molt d'esforç per a que tots els becaris estiguem en les millors condicions. Gràcies a tots els companys que s'han involucrat en temes més polítics, per dir-ho d'alguna manera, als representants de becaris pel seu empeny per a que estiguéssim ben informats, pel suport que m'han donat i també agrair la seva iniciativa per motivar a la gent per a que tiri endavant. Gràcies ho heu fet molt bé.

A Núria i a Miriam, hem compartit tantes hores en cultius. Estan vosaltres allà, mai m'han faltat 5 minuts de campana ni un rato de conversa davant la centrífuga. M'agrada molt la vostra forma de ser, irradieu felicitat, tothom us coneix. Us estimo molt! Ha estat una sort per mi conèixer-vos i compartir tots aquest anys amb vosaltres.

Fa res, estaven parlant de com portàvem els experiments i ara de que farem d'ara endavant. Com passa el temps!! Espero que en el futur us vagi molt bé.

A Quique, Enrique de Madaria, per haver-me donat l'oportunitat de conèixer l'aspecte més clínic de la pancreatitis. Per transmetre la seva passió per la ciència i la medicina i contribuir a que ciència i medicina s'entenguin. Gracies als grups de Pancrees que ens acompanyen en els congressos (grups de Salamanca, Galicia, València, Alacant, Barcelona, a J lovanna) per la vostra amiatat i suport. Gracies a tots vosaltres per sempre estar disposat a col·laborar en la ciencia.

Voldria agrair a totes les persones que al principi em van donar suport per aconseguir aquesta feina. En especial, a Elena Lagarda per presentar-me a Oriol, i a Lucia Olmos per enfrontar-se amb la secretaria de la universitat de Valencia cada cop que necessitava un paper.

A Pere Bausac. Ell va ser professor meu a d'institut, ara fa molts d'anys. Ell va ser el primer que em va ensenyar a pensar. Ell em va ensenyar que la teoria escrita en els llibres estava basada en el món real. Estava empenyat en que els seus alumnes entenguessin el que estudien i que la forma en que s'escriuen les coses es tant important com saber-les.

Però sobretot m'agradaria agrair a la meva família, el haver-me donat les eines que m'han ajudat a arribar on estic ara. Gracies pares per tot l'esforç que heveu fet per mi durant tot aquest temps, per estar contents de mi i intentar entendre el que faig. Als meus tiets i cosins per animar-me dia a dia a tirar endavant. Tots sou molt importants per mi.

A Ali i Elena per estar ahi sempre. Per involucrar-vos en el que faig, aguantar-me en tot moment, per donar-me tant suport moral com material. Per vosaltres la distancia no ha estat mai un motiu de separació, sempre us he sentit molt prop meu. Sou les millors i us estimo moltíssim.

ÍNDIX DE CONTINGUTS:

Índex de figures

Índex de taules

Abreviatures

Introducció

1. EL PANCREES

- 1.1. Origen i morfologia del pàncrees
- 1.2. Fisiologia i bioquímica del pàncrees exocrí

2. LA PANCREATITIS AGUDA

- 2.1. Fisiologia de la pancreatitis aguda
- 2.2. Etiologia
- 2.3. Epidemiologia i classificació de la pancreatitis
- 2.4. Síntomes i signes de la pancreatitis aguda
- 2.5. Resposta inflamatòria durant la pancreatitis aguda
 - 2.5.1. Líquid ascític associat a la pancreatitis
 - 2.5.2. SIRS i FMO
 - 2.5.3. Inflamació pulmonar associada a la pancreatitis aguda
 - 2.5.4. Implicació dels lípids durant la pancreatitis aguda
 - 2.5.5. Paper de NF-kB
 - 2.5.6. Paper de PPAR γ

3. MACRÒFAGS

- 3.1. Paper dels macròfags en la pancreatitis aguda
- 3.2. Els macròfags
 - 3.2.1. Biologia dels macròfags
 - 3.2.2. Origen i diferenciació
- 3.3. Activació dels macròfags
- 3.4. Mecanismes moleculars que regulen l'activació dels macròfags.

Hipòtesi i objectius

Material i mètodes

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

- 1.1 Animals d'experimentació
- 1.2 Model experimental

2. DISSENY EXPERIMENTAL

- 2.1 Estudi 1
- 2.2 Estudi 2
- 2.3 Estudi 3

3. MÈTODES

3.1 Aïllament i cultiu de macròfags

3.1.1 Aïllament i cultiu de macròfags peritoneals

3.1.2 Aïllament i cultiu de macròfags alveolars

3.1.3 Aïllament i cultiu de macròfags intersticials de pulmó

3.2 Anàlisi de marcadors d'activació dels macròfags.

3.2.1 PCR a temps real

3.3 Determinació de dany pancreàtic i paràmetres inflamatoris

3.3.1 Lipasa

3.3.2 Mieloperoxidasa

3.3.3 Generació de nitrits

3.3.4 Lipoperòxids

3.4 Preparacions histològiques

3.5 Inmunohistoquímica

3.6 Western blot

3.7 DNA-binding

3.8 Anàlisi estadística

Resultats i articles

Estudi 1

Gea-Sorli S; Closa D. In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. *BMC Immunology*. 2009; 10:42

Estudi 2

Franco-Pons N; Gea-Sorlí S; Closa D. Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. *The Journal of Pathology* 2010; 221:175-182

Estudi 3

Gea-Sorli S; Guillamat R; Serrano-Mollar A; Closa D. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. *The Journal of Pathology* 2010; 223:417-424

Informe del director del factor de impacte dels articles publicats

Discussió

Conclusions

Bibliografia

ÍNDIX DE FIGURES

- Figura 1: Localització i arquitectura del pàncrees humà.
- Figura 2: Anatomia del pàncrees
- Figura 3: Paper de l'activació de la tripsina en la pancreatitis aguda
- Figura 4: Portada de l'article d'en HR Fitz.
- Figura 5: Esdeveniments fisiopatològics i alliberament de mediadors en la pancreatitis aguda.
- Figura 6: Evolució les alteracions de la lesió pulmonar durant la progressió de la PA
- Figura 7: Augment de la infiltració de leucocits en el teixit adipós blanc durant la progressió de la PA.
- Figura 8: Lípid modificat presents en el PAAF actuen com a lligands del PPAR γ , interferint en l'activació normal de NF- κ B.
- Figura 9: Origen i diferenciació dels macròfags. Llinatge mieloide.
- Figura 10: Esquema de l'activació dels macròfags.
- Figura 11: Model experimental de PA amb taurocolat sòdic.
- Figura 12: Cinètica de citocines proinflamatòries.

ÍNDIX DE TAULES

- Taula 1: Principals factors etiològics implicats en la pancreatitis.
- Taula 2: Seqüència d'oligonucleòtids utilitzats en la PCR a temps real.

ABREVIATURES:

AP-1:	Proteïna activadora-1
ADN:	Àcid desoxirribonucleic
ARN:	Àcid ribonucleic
Arg-1:	Arginasa1
BSA:	Albúmina sèrica bovina
CCL:	Quemoquina lligand
CPRE:	Colangiopancreatografia retrograda endoscòpica
CSF	<i>Colony stimulating factors</i>
C/EBP α :	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
15-d-PGJ2:	15-deoxi- Δ (12,14)-Prostaglandina J ₂
DAMP:	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC-SIGN:	<i>Dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin</i>
DEPC:	<i>Dietil pirocarbonada</i>
DAB:	Diaminobenzidina
FLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂
FMO:	Fallida multiorgànica
GAPDH:	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GM-CSF:	<i>Granulocyte-macrophage CSF</i>
IMC:	Índex de masa corporal
H-E:	Hematoxilina-eosina
IL1:	Interleuquina 1
IL6:	Interleuquina 6
IL4:	Interleuquina 4
IL13:	Interleuquina 13
IL4R α :	Receptor de la interleuquina 4
INF γ :	Interferó- γ
iNOS:	Òxid nítric sintasa induïble
IRF-7:	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
LPS:	Lipopolisacàrid
MAPK:	Proteïna quinasa activada per mitògens
MCP-1:	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>

M-CSF:	<i>Macrophage-CSF</i>
MDA:	Malondialdèhid
MHCII:	Complex major d'histocompatibilitat classe II
MPO:	Mieloperoxidasa
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduït
NF-κB:	Factor nuclear κB
NLR:	Receptors tipus <i>NOD</i>
NO:	Òxid nítric
NO ₂ ⁻ :	Nitrit
PA:	Pancreatitis aguda
PAAF:	<i>Pancreatitis associated ascidic fluid</i>
PAF:	Factor activador de plaquetes
PAMP:	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS:	Tampó fosfat
PBS-T:	PBS amb tritó al 0.2 %
PCR:	Reacció en cadena de la polimerasa
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE:	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
RLO:	Radicals lliure d'oxigen
RPMI 1640:	Medi de cultiu Roswell park memorial institute
RXRα:	Receptor X retinoid alfa
SIRS:	Síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica
SDRA:	Síndrome de distres respiratori agut
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodecyl sulphate-poliacrilamide gel electroforesis</i>
SOD:	Superòxid dismutasa
STAT:	Senyals de transducció i activadors de la transcripció
TAB:	Teixit adipós blanc
TC:	Tomografia computeritzada
TGFβ:	Factor de creixement transformant beta
TLR:	Receptors tipus <i>Toll</i>
TMB:	Tetrametilbenzidina
TNFα:	Factor de necrosi tumoral alfa
XOD:	Xantina oxidasa

INTRODUCCIÓ

1 EL PÀNCREES.

1.1 Origen i morfologia del Pàncrees.

El terme pàncrees prové de *παν κρεας* (pan kreas) que significa en grec, “tot carn”. Heròfil de Calcedònia (335-280 a C) i Erasístrat (304-250 a C) van ser els primers anatomistes que van descriure el pàncrees al segle III a. C., però la seva importància vital no es va descobrir fins molt més tard. Al 1642 Johan Georg Wirsung va descriure el conducte excretor principal que porta el seu nom, i no va ser fins la meitat del segle XIX quan Paul Langerhans va descriure la seva estructura histològica. Al 1856 Claude Bernard va induir la primera pancreatitis experimental i va descobrir l'efecte de la lipasa. Finalment, al 1889 va aparèixer la primera publicació, en la que Reginald Heber Fitz explicava els canvis clínics i anatomopatològics en malalts amb pancreatitis aguda greu (Fitz HR. 1889).

El pàncrees és un òrgan que en humans, mostra una longitud que varia entre 15 i 25 cm i pesa entre 70 i 150 g en l'adult. Es troba situat en la cavitat peritoneal en la part superior del retroperitoneu i està en íntim contacte amb altres òrgans com l'estómac, el duodè, el colon transvers, el ronyó i la glàndula suprarenal (Figura1) (Bardeesy, N. 2002).

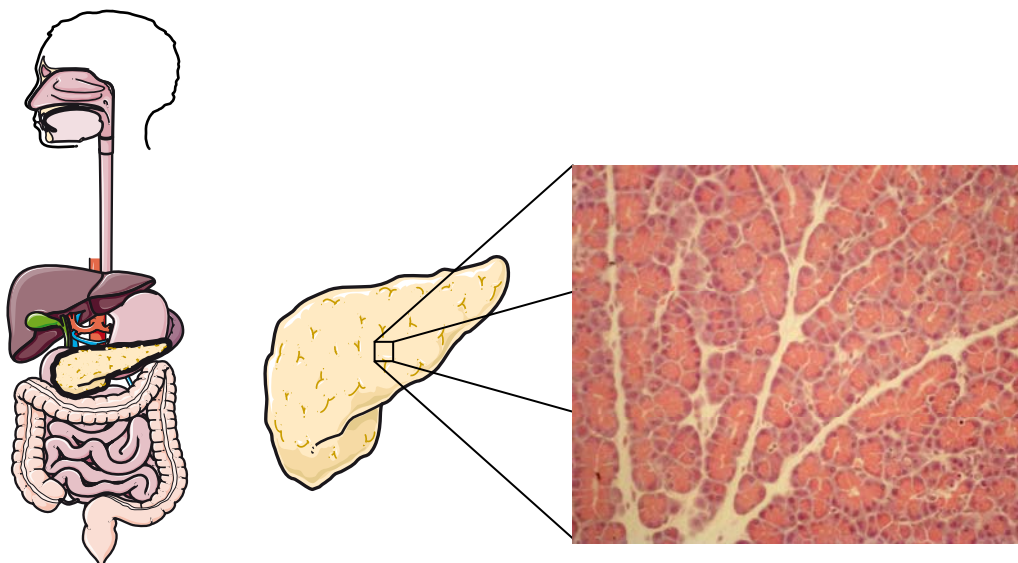


Figura 1: Localització i arquitectura del pàncrees humà. Estructura d'un acinus pancreàtic.

El pàncrees és una glàndula digestiva que presenta funcions exocrines i endocrines. La part endocrina representa al voltant d'un 2 % de la massa total i està formada per grups cel·lulars dispersos per tot el parènquima, els illots de Langerhans. La seva funció és la secreció d'hormones essencials per al control del metabolisme de la glucosa. El pàncrees endocrí està format per 4 tipus cel·lulars: majoritàriament per cèl·lules β encarregades de secretar insulina i cèl·lules α que secreten glucagó. En menor proporció, per cèl·lules γ i pp que s'encarreguen de secretar somatostatina i el pèptid pancreàtic, respectivament. El pàncrees exocrí comprén aproximadament el 85 % de la glàndula i s'encarrega de la secreció dels suc digestius al duodè a través del conducte pancreàtic (Navarro S i cols. 2002)

1.2 Fisiologia i bioquímica del pàncrees exocrí

El pàncrees exocrí està organitzat en lòbuls separats per zones de teixit connectiu pel qual passen vasos sanguinis, vasos limfàtics, nervis i conductes interlobulars. L'estructura interna dels lòbuls consisteix en acins formats per una monocapa de cèl·lules epitelials que envolten la llum acinar (Figura 2) (Morgenroth K i cols 1991).

La cèl·lula acinar del pàncrees té forma piramidal i el nucli, arrodonit, es localitza a la part basal del citoplasma. Aquesta és la cèl·lula amb major capacitat de síntesi proteica de l'organisme i presenta un reticle endoplasmàtic molt gran, agrupat en la regió basal de la cèl·lula. L'aparell de Golgi constitueix el segon orgànul de les cèl·lules acinars i és on es col·lecten i es processen les secrecions pancreàtiques. Es sap, per mètodes autoradiogràfics, que la barreja de les substàncies secretores és transportada a l'aparell de Golgi entre 15 i 20 min després de la seva síntesi. Posteriorment, al citoplasma apical s'acumulen i emmagatzemen les proteïnes en els anomenats grànuls de zimogen. La llum de cada àcinus està envoltada per cèl·lules centreacinars encarregades d'elaborar compostos bicarbonatats que es troben al suc pancreàtic.

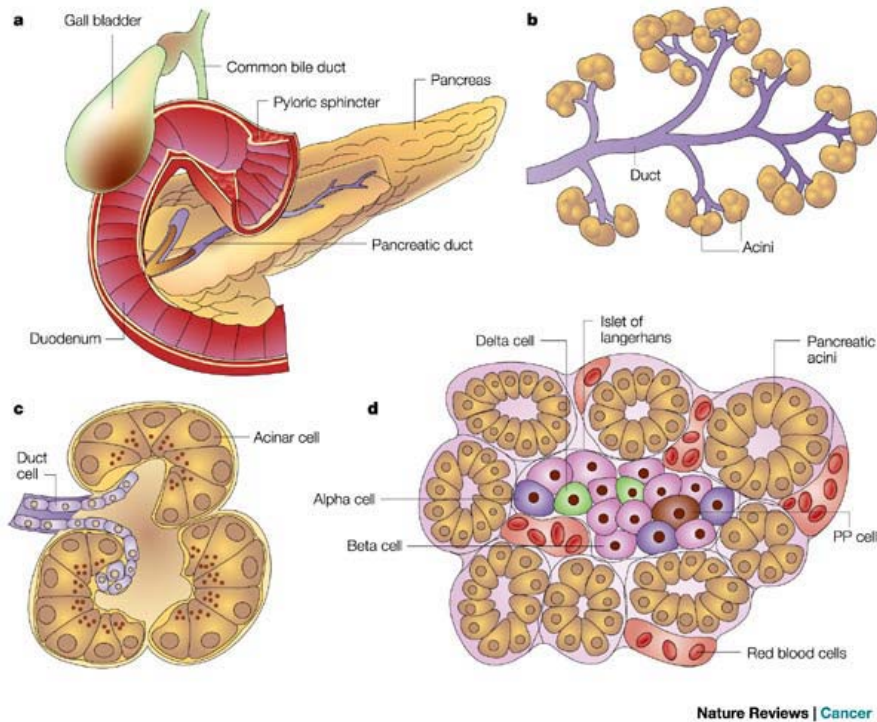


Figura 2: Anatomia dels pàncrees: el pàncrees exocrí està constituït per cèl·lules ductals i l'endocrí consta de quatre tipus cel·lulars especialitzats i organitzats en illots compactes dins del teixit acinar. (a) Anatomia del pàncrees, (b) pàncrees exocrí, (c) àcinus aïllat i (d) illot pancreàtic rodejat de teixit pancreàtic exocrí. (Bardeesy N i col 2002)

La secreció del pàncrees exocrí està regulada bàsicament per estímuls nerviosos i per les hormones gastrointestinals: secretina, gastrina i colecistoquinina. La producció de suc pancreàtic en humans varia entre 1,5 i 2 l diaris i conté més de 20 enzims diferents. La majoria són sintetitzats en forma de proenzims inactius o zimògens i només són activats quan arriben al duodè. Allà actua l'enteropeptidasa, sintetitzada a l'epiteli intestinal, transformant el tripsinogen (precursor inactiu) en tripsina (Morgenroth K i cols 1991). La tripsina és l'enzim clau que activa la resta dels zimògens.

L'aspecte més important de la cèl·lula acinar és la seva perillositat; ja que una activació prematura dels enzims pancreàtics portaria a la pròpia digestió del pàncrees (Chiari H. 1986). Precisament aquest fet es considera essencial en l'aparició i desenvolupament de la pancreatitis aguda (PA).

En condicions fisiològiques normals, aquest fenomen no té lloc donat que el pàncrees ha desenvolupat múltiples sistemes d'autoprotecció com ara: la síntesi d'enzims proteolítics en forma de precursors inactius o zimògens, l'elevada resistència de la cèl·lula acinar a l'acció de la quimiotripsina, tripsina i fosfolipasa A₂, i la producció pancreàtica d'inhibidors específics de proteases que són transportats juntament amb els enzims inactius a través de la cèl·lula, com és el cas de la proteïna inhibidora de la tripsina.

El sistema ductal del pàncrees exocrí està molt menys caracteritzat que l'acinar, un fet sorprenent si es té en compte que les dues principals patologies associades al pàncrees (pancreatitis i adenocarcinoma pancreàtic) probablement tenen el seu origen en ell (Brad D.J. i cols 1998; Hilgers W i col 1999). Aquest sistema és utilitzat per transportar el suc pancreàtic i està format per un sistema de conductes (Wirsung i Santorini) que van fins al canal biliar comú. En general, està revestit per una sola capa de cèl·lules epitelials. La producció de mucus per part de l'epiteli ductal és necessària per facilitar el transport de la secreció i per protegir a les cèl·lules dels enzims segregats.

2. LA PANCREATITIS AGUDA

2.1 PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda és un procés inflamatori agut del pàncrees, desencadenat per una activació inapropiada dels enzims pancreàtics, amb lesió tissular i resposta inflamatòria local, que pot desembocar en una resposta sistèmica i fallida multiorgànica. La pancreatitis es classifica com aguda a no ser que, per tomografia computeritzada (TC) o per colangiopancreatografia retrograda endoscòpica (CPRE), es trobin signes de pancreatitis crònica. Aquesta malaltia normalment és un procés reversible. Durant un atac agut és possible que les funcions pancreàtiques exocrines i endocrines no siguin normals. La funció endocrina retorna a la normalitat poc després de la fase aguda, mentre que la exocrina pot necessitar molt més temps per recuperar-se per complet.

La PA està causada per un desajust en els diferents factors involucrats en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular del pàncrees, que inclou una cascada d'esdeveniments que comencen dins la cèl·lula acinar. El mecanisme exacte que indueix aquesta malaltia encara és objecte de debat. El més comú i acceptat és que la pancreatitis comença per un dany en la cèl·lula acinar, el qual permet l'alliberament d'enzims pancreàtics (tripsina, quimotripsina, elastasa, lipasa, hidrolases lisosomals) a l'interior de l'òrgan, iniciant-se així tot un procés de digestió del pàncrees (Figura 3). Aquest procés causa el trencament de membranes cel·lulars i la desestructuració de l'arquitectura pròpia dels acins provocant edema, dany vascular, hemorràgia i necrosi. (Van Acker GJ i cols 2002)

Encara que no hi ha dubtes sobre la potencial perillositat de l'activació dels enzims digestius, els intents per tractar la pancreatitis usant inhibidors d'aquests enzims han fracassat reiteradament. Aquest fet ha posat de manifest que la PA no és únicament un procés autodigestiu. És per aquest motiu que durant els últims anys s'han publicat un gran nombre de treballs centrats en mecanismes relacionats en la resposta inflamatòria. Aquests treballs descriuen

el paper de diferents mediadors, com els metabòlits de l'àcid araquidònic, l'òxid nítric i, especialment, les citocines i les molècules d'adhesió necessàries per al reclutament de leucocits (Closa D i cols 1994; Molero X i cols 1995).

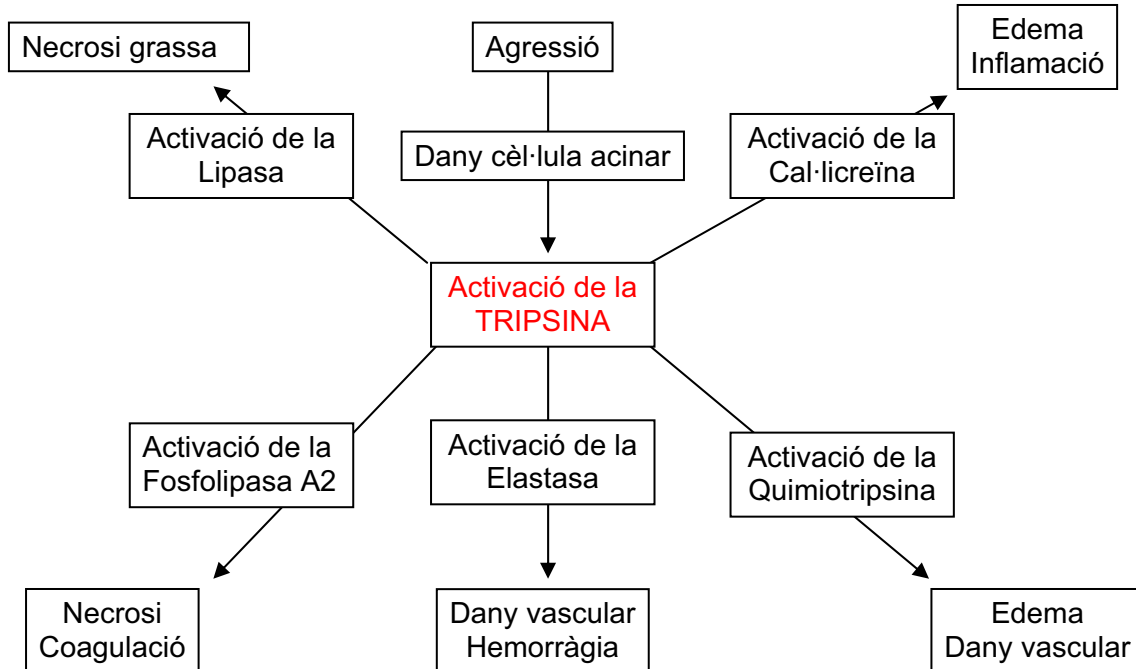


Figura 3: Paper de l'activació de la tripsina en la patogènesi de la pancreatitis aguda. (Sakorafas GH i cols 2000)

Diferents estudis clínics han determinat un increment en els nivells sèrics de diferents citocines en pacients amb PA, així com una correlació directa entre els nivells d'aquestes citocines i la gravetat de la PA (De Beaux AC i cols 1996). Entre aquestes citocines s'inclouen el TNF α (factor de necrosi tumoral alfa), la interleuquina1 (IL1) i la Interleuquina6 (IL6). Aquests mediadors poden induir la infiltració de monòcits i neutròfils polimorfonuclears que, a la vegada, poden generar grans quantitats de substàncies tòxiques, incloent radicals lliures d'oxigen i enzims hidrolítics. A més a més, les citocines actuen induint la síntesi de més citocines, amplificant la resposta inflamatòria tant a nivell local com a nivell sistèmic.

Els mediadors de la inflamació serien el nexe d'unió entre la lesió pancreàtica, un procés inicialment local, i la lesió dels òrgans a distància que fan d'aquest procés una malaltia sistèmica.

2.2 Etiologia:

La llista de factors etiològics en pancreatitis aguda és extensa, tal i com es recull en la Taula 1. Tot i això, les dues causes més freqüents són les malalties de la via biliar i l'alcoholisme, responsables cadascuna de prop d'un terç dels casos.

Taula 1: Principals factors etiològics implicats en la pancreatitis aguda

1. **Litiasi biliar:** 40-50 % dels casos. Malgrat tot, sols en el 20-30 % es troba el càlcul biliar a la papil·la. El fang biliar i la microlitiasi són factors de risc pel desenvolupament de la PA i probablement són la causa de la majoria de les PA idiopàtiques.
2. **Alcohol:** 35 % de les PA. És poc freqüent en bevedors ocasionals.
3. **Post-CPRE:** Hi ha hiperamilasèmia en el 50 % de les CPRE i símptomes en el 1-10 % dels casos.
4. **Post-quirúrgica:** En cirurgia major cardíaca i abdominal. Alta mortalitat (10-45 %).
5. **Hipertrigliceridemia:** Amb trigliceridemia >1000 mg/dl. Mecanisme desconegut.
6. **Idiopàtica:** Representa el 10 % dels casos.
7. **Fàrmacs:** Azatioprina, valproat, estrògens, metronidazol, pentamidina, sulfonamides, tetraciclins, eritromicina, trimetropin, nitrofurantoïna, diürètic de nansa, tiazides, metildopa, mesalamina, sulindac, paracetamol, salicilats, cimetidina, corticoides, ddl, L-asparginasa, 6-mercaptapurina, procainamida, cocaïna, IECA.
8. **Infeccions:**
 - Virus: VIH, CMV, parotiditis, Coxsackie, EBV, rubèola, varicel·la, adenovirus.
 - Bacteris: *Mycoplasma*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Leptospira*, TBC.
 - Paràsits: *Àscaris*, *Fasciola hepàtica*.
9. **Traumatisme.**
10. **Metabòlica:** Hipercalcèmia, insuficiència renal.
11. **Obstructiva:** Obstrucció de la papil·la de Water (tumors periampulars, diverticle yustacapil·lar, síndrome de la nansa aferent, malaltia de Crohn duodenal), pàncrees divisum, pàncrees anular, tumor pancreàtic, hipertomia de l'esfínter d'Oddi.
12. **Tòxics:** Organofosforats, verí d'escorpí.
13. **Vasculars:** Vasculitis, hipotensió, èmbols de colesterol.
14. **Malalties associades a la PA:** Pancreatitis hereditària, úlcera duodenal penetrada, hipotèrmia, trasplantament d'òrgans, fibrosi quística, cremades, carreres de fons.

2.3 Epidemiologia i classificació de la pancreatitis

La variabilitat en la presentació, etiologia i evolució clínica de la PA ha dificultat el seu estudi. Després de la primera descripció de la PA per Reginald Heber Fitz en 1889 (Figura 4) hi ha hagut molts intents per classificar la malaltia basant-se inicialment en criteris post-mortem o per descobriments en cirugies.

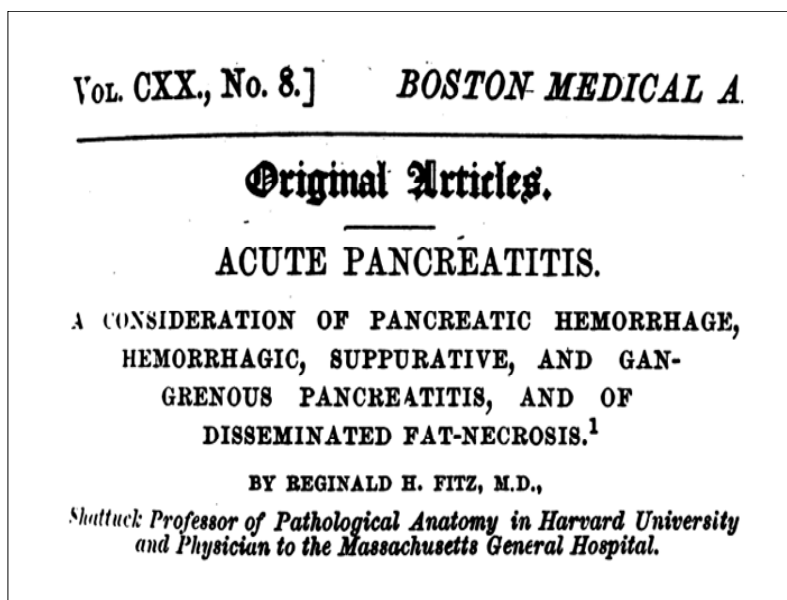


Figura 4: Portada de l'article d'En HR Fitz (Fitz HR. 1889)

La incidència de la PA sembla haver-se incrementat notablement en els últims anys i en la majoria de registres es troben entre 5 – 11 casos per 100000 habitants i any. Aquesta incidència mostra amplies variacions d'uns països a altres. Aquestes diferències poden estar influïdes per falta d'uniformitat en els criteris de diagnòstic, per el interès posat en la seva identificació, així com per les diferents incidències dels factors etiològics en les poblacions de referència. La mitjana d'edat de presentació de la població afectada és de uns 55 anys, i la majoria dels casos es troben entre els 30 i 70 anys.

En el simposi celebrat a Atlanta en 1992 es va establir un sistema de classificació basat en aspectes clínics per la pancreatitis (Bradley EL 1993) L'objectiu d'aquesta reunió va ser establir estàndards internacionals per definir d'aquesta malaltia i les seves complicacions, fent possible uns criteris uniformes que permetessin la selecció de pacients per possibles assajos prospectius. En aquest simposi es van considerar dos tipus de PA: la

intersticial, que afecta al 85 % dels pacients i la necrosant, que inclou el 15 % restant (Dziurkowska-Marek A i cols 2004, Blum T i cols. 2001). D'aquests últims el 33 % presenta infecció de la necrosi (De Beaux AC i cols 1995). Aproximadament el 10 % de la PA intersticial presenta fallida orgànica, generalment transitòria i amb una taxa de mortalitat quasi inexistent. Malgrat tot, la prevalença mitjana de la fallida orgànica en la PA necrosant és del 54 %, i és més elevada en la necrosi infectada (34-89 %) que en la necrosi estèril (45 %-73 %) (Perez A i cols 2002; Lankisch PG i cols 2000; Pederzoli P i cols 1993). La mortalitat en absència de fallida orgànica és poc freqüent, però en el cas de fallida d'un òrgan és del 3 % i, si és multiorgànica del 47 % (Isenmann R i cols 1999). La mortalitat deguda a aquesta causa sol presentar-se dins de les primeres dues setmanes, mentre que si està provocada per la infecció de la necrosi o per complicacions de la necrosi estèril es produeix després d'aquestes dues setmanes. Per totes aquestes raons, la PA constitueix un important problema de salut.

2.4 Síntomes i signes de la pancreatitis aguda

El dolor abdominal és el símptoma fonamental i està present des del començament en la major part dels atacs de PA. Pot estar precedit per un còlic biliar o consum d'alcohol dintre de les 72 h prèvies. Normalment es localitza en tot l'hemiabdomen superior, però pot limitar-se únicament al mesoepigastri, a l'hipocondri dret i més rarament, al costat esquerre. El dolor empitjora en decúbit i en un 50 % dels casos s'irradia a l'esquena "en cinturó". Sol ser d'intensitat creixent, arribant a una màxim en 30-60 min, i pot romandre constant durant hores o dies amb una intensitat que pot variar de moderada a molt intensa. Les nàusees i els vòmits estan presents en el 80 % dels casos.

En l'exploració física pot existir poca correlació entre la intensitat del dolor i el que es troba en l'exploració abdominal. Amb la palpació es pot percebre una sensació d'empastament en la regió epigàstrica-abdomen superior, amb un important dolor en aquesta zona, però els signes de irritació peritoneal rares vegades apareixen. Els pacients amb pancreatitis lleu poden tindre únicament una lleu sensibilitat a la palpació abdominal. Amb freqüència existeix distensió abdominal i absència de peristaltisme per ili paralític associat.

A nivell cutani podem trobar icterícia secundària a coledocolitiasi o a altres causes d'obstrucció de la via biliar o inclús per a una malaltia hepàtica coexistent. L'equimosi periumbilical (signe de Cullen) o en flancs (signe de Gray-Turner) són poc freqüents i indiquen mal pronòstic. La necrosi del greix subcutani, que es manifesta en nòduls subcutanis i panniculitis, normalment en les extremitats inferiors, és característica però també infreqüent.

Una dada a tenir en compte és l'obesitat ja que un índex de massa corporal (IMC) >30 % s'associa a mal pronòstic.

2.5 Resposta inflamatòria durant la pancreatitis aguda

Durant la PA es produeix una inflamació del pàncrees secundària a l'activació intragranular dels enzims pancreàtics, cosa que produeix alteracions de la microcirculació: vasoconstricció, disminució de la saturació d'oxigen i isquèmia progressiva. Aquestes anormalitats augmenten la permeabilitat vascular i produeixen edematització de la glàndula i, a més a més, poden produir extravasació al peritoneu de fluid intravascular ric en proteïnes.

En la PA, la síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS) és freqüent i possiblement es produeixi degut als enzims pancreàtics i citocines activades i alliberades a la circulació des del pàncrees inflammat. Alguns pacients amb dany pancreàtic greu, desenvolupen complicacions sistèmiques greus, com febre, síndrome de distrés respiratori agut (SDRA), vessaments pleurals, insuficiència renal, shock i complicacions metabòliques (hipocalcèmia, hiperlipidèmia, hiperglucèmia, hipoglucèmia). En el curs d'una PA és molt probable que, per isquèmia intestinal, es trenqui la barrera intestinal i permeti la translocació bacteriana des de l'intestí, cosa que pot provocar una infecció local i sistèmica.

El grup de Norman (Norman i cols 1995a) ha posat de manifest que després de la inducció de la PA els macròfags són els activadors de la resposta inflamatòria. Amb la seva capacitat d'activar a altres leucocits i produir grans quantitats de mediadors proinflamatoris, estenen i amplifiquen la inflamació. Estudis *in vitro* de monòcits obtinguts de pacients amb pancreatitis aguda es troben activats, i presenten un augment en la secreció de TNF α i IL6 en el medi de cultiu cel·lular (McKay CJ i cols 1996).

Els enzims pancreàtics activats, la disfunció de la microcirculació, l'activació de leucocits i l'alliberament de mediadors inflamatoris comporta un ràpid deteriorament del teixit pancreàtic i la necrosi (Figura 5). La interacció entre aquests factors fan difícil valorar el paper desenvolupat individualment per ells a l'hora de induir la lesió pancreàtica. Tot plegat fa que la inflamació s'estengui fora del pàncrees induint la formació de líquid ascític que s'acumula en la cavitat peritoneal, provocant una resposta inflamatòria sistèmica que pot desembocar, en els casos més greus, en una fallida multiorgànica (FMO) (Ogawa M i cols 1998, Sakorafas GH i cols 2000).

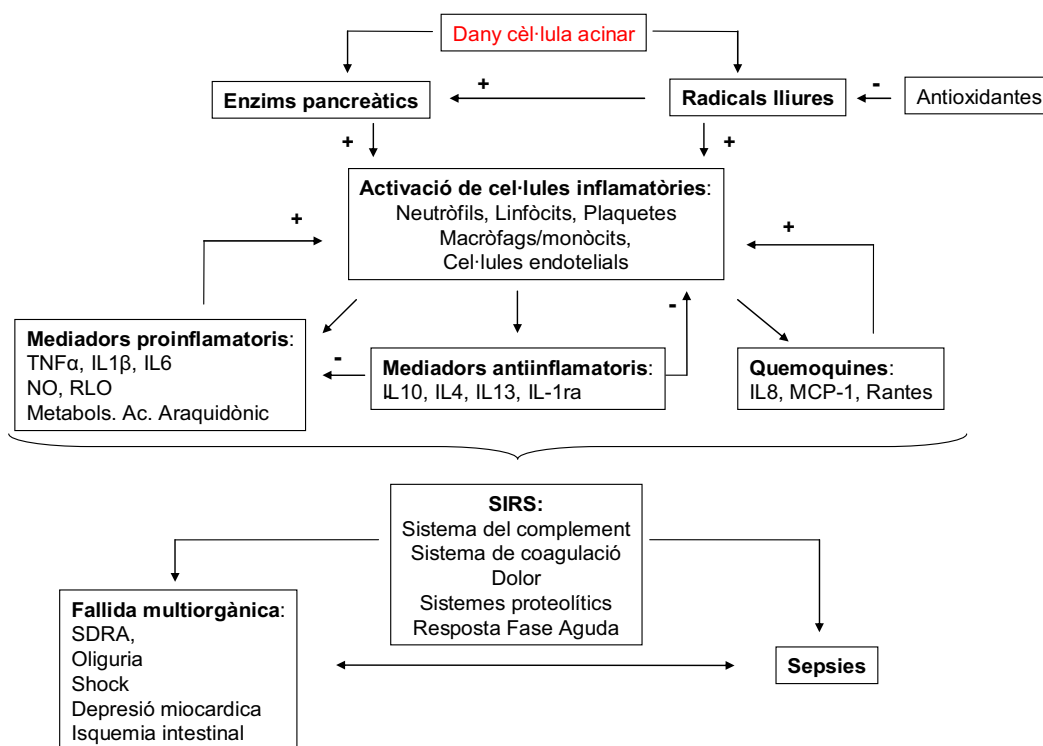


Figura 5 : Esdeveniments fisiopatològics i alliberament de mediadors en la pancreatitis aguda.

2.5.1 Líquid ascític associat a la pancreatitis

Molts treballs descriuen la contribució que l'ascítis pancreàtica té en la fisiopatologia i evolució de la PA i en l'afectació sistèmica (Sato A i cols 1999). Aquest líquid ascític associat a la pancreatitis aguda (PAAF) és ric en proteïnes, enzims pancreàtics com lipasa, amilasa i d'altres. S'ha demostrat que durant la PA hi ha un increment de la permeabilitat peritoneal que contribueix al pas d'enzims pancreàtics a través del peritoneu al torrent

circulatori (Sevensson C i cols 1989). A més a més, en l'ascítis pancreàtica es detecten mediadors proinflamatoris, l'origen dels quals semblen ser els macròfags peritoneals activats que contribueixen a la generalització de la inflamació. Tot i això, aquestes citocines no semblen ser els únics factors inflamatoris presents en l'ascítis, ja que continua provocant efectes sistèmics encara que no hi hagi la presència d'aquestes citocines (Denhain W. 1997).

S'ha descrit que el rentat del PAAF de la cavitat peritoneal és beneficiós per la taxa de supervivència en un model experimental de pancreatitis hemorràgica (Niederau C i cols 1988) encara que aquest rentat no ha millorat molt les taxes de mortalitat i morbiditat en assajos clínics (Platell C i cols 2001).

2.5.2 Síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica i fallida multiorgànica

La PA és un procés inflamatori localitzat inicialment en el pàncrees però que, depèn de l'estat de la cèl·lula acinar i de la intensitat i persistència dels factors agressors causals, pot ser el inductor d'una resposta inflamatòria sistèmica exagerada.

La SIRS està induïda per mediadors inflamatoris sistèmics com l'estrés oxidatiu, PAF (factor activador de plaquetes), citocines (TNF α , IL1, IL6, IL10, Interferó γ (INF γ), etc.), FLA₂ (Fosfolipasa A₂), molècules d'adhesió i per l'activació de cèl·lules inflamatòries (neutròfils, mastòcits, endoteli vascular). En la PA la SIRS pot manifestar-se al inici de la malaltia i fer-se més intensa amb l'aparició de noves agressions com la sèpsies, cirurgies o complicacions vasculares.

La importància de reconèixer la SIRS està en el fet de que un tractament adequat pot reduir el procés. Si la SIRS evoluciona, l'extensió del procés inflamatori a altres òrgans es fa més patent (pulmó, ronyó, sistema cardiovascular) i pot conduir a la fallida funcional dels mateixos. Es considera que la FMO és conseqüència de la SIRS i es presenta aproximadament en un 30 % dels pacients amb sepsis, en un 40 % dels pacients amb cremades i en un 24 % de les pancreatitis agudes greus.

La FMO és una de les característiques que tipifiquen la PA greu segons la classificació d'Atlanta. Al igual que la SIRS, la fallida multiorgànica presenta dos pics de incidència en el curs d'una pancreatitis aguda que tendeixen a solapar-se: la major part dels casos ocorren en una fase inicial (aproximadament durant els primers 7 dies de malaltia), on es pensa que la FMO es conseqüència d'un excés de resposta inflamatòria aguda inicial. Superada aquesta fase inicial, pot tornar a aparèixer FMO (segon atac) en resposta a una agressió posterior (segona - quarta setmana), generalment per infecció i sepsis. El tractament ha de ser de suport intensiu i és important identificar, i tractar, les causes desencadenants. Tot i això, un cop desencadenada la FMO la mortalitat augmenta i guarda una relació amb el nombre d'òrgans afectats.

Malgrat tot, es desconeixen els factors que determinen que la progressió de la PA sigui auto-limitada en alguns casos mentre que en d'altres es desencadeni un procés de inflamació sistèmica fulminant.

2.5.3 Inflamació pulmonar associada a la pancreatitis aguda

El trastorn orgànic més freqüent que pot sorgir durant la pancreatitis ocorre a nivell pulmonar i es considera la causa més important de mortalitat immediata (De Campos 2007). La disfunció pulmonar s'observa en el 50 % dels pacients amb PA severa i és un dels factors més importants de mort en la primera setmana de la malaltia (Buter A i cols 2002). Malgrat els avanços en el diagnòstic i el tractament de la inflamació pancreàtica, l'únic tractament efectiu per a les complicacions pulmonars és el de manteniment vital en els serveis de cures intensives (Werner J i cols 2003). Tot i que s'està fent un gran esforç per a esbrinar els mediadors implicats en la lesió pulmonar associada a la pancreatitis aguda, encara no es coneixen tots els mecanismes pels que una lesió localitzada en el pàncrees pot induir una afectació en òrgans distants i especialment, al pulmó.

En els models experimentals on es va caracteritzar les alteracions histològiques de la lesió pulmonar associada a la PA, es va descriure una important proliferació i migració de leucocits polimorfonuclears a l'interior dels capil·lars

pulmonars (Steer ML i cols 2001). Posteriorment s'observaven alteracions en les cèl·lules endotelials, edema intersticial i engruiximent de la membrana alveolocapil·lar amb el consegüent augment del pes sec. Finalment, es produeix la destrucció hemorràgica dels alvèols i la pèrdua completa de l'arquitectura alveolar (Figura 6). Aquests canvis morfològics que suposen un augment de la permeabilitat vascular, es tradueixen funcionalment com la interferència en el intercanvi gasos i produeix l'alteració de la relació ventilació-perfusió donant lloc a la hipoxèmia (Feddersen CO i cols 1991; Willemer S i cols 1991).

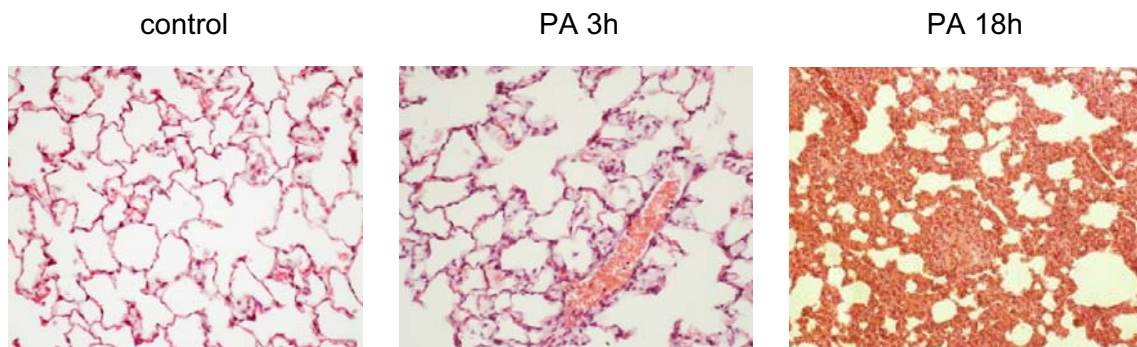


Figura 6: Evolució les alteracions de la lesió pulmonar durant la progressió de la PA. Alteracions com la infiltració de leucocits i el col·lapse alveolar. (H-E)

Diferents línies de investigació sobre la patogènesi de la lesió pulmonar en la PA han suggerit múltiples mecanismes que podrien estar implicats. La majoria d'aquestes hipòtesis condicionen l'aparició de la lesió pulmonar a l'acció d'un intermediari que després de la seva activació en el pàncrees desencadena diferents efectes sistèmics. Entre aquests mediadors hi ha la xantina oxidasa (XOD), el TNF α , el complement activat, la FLA₂ o l'elastasa, però no l'amilasa, la lipasa o la tripsina (Folch E i cols 2003).

Un d'aquests mecanismes implica l'acció de les proteases alliberades pel pàncrees inflammat a la circulació sistèmica (Tahamont MV i cols 1982). Aquesta acció se li va atribuir a la fosfolipasa, ja que la instil·lació de FLA₂ a nivell pulmonar produeix edema alveolar, acumulació de cèl·lules inflamatòries, alteració de intercanvi gasos i alta mortalitat (Edelson JD i cols 1991). La FLA₂ participa de forma determinant en molts processos inflamatoris per la seva

acció directa sobre les membranes cel·lulars, com a inductor de la síntesi d'altres productes proinflamatoris i per la seva acció com a segon missatger intracel·lular.

A l'observar preparacions histològiques pulmonars, tant de pacients com d'animals d'experimentació amb PA severa i lesió pulmonar, apareix un important infiltrat pulmonar inflamatori, fonamentalment format per polimorfonuclears; això suggereix que es produeix un quimiotactisme dels neutròfils als pulmons i un augment de la permeabilitat vascular pulmonar. En els últims anys van augmentant les evidències de que certs factors derivats dels macròfags alveolars exerceixen un important poder quimiotàctic (Kyriakides C i cols 2001). Per una altra banda, l'elastasa pancreàtica és un potent quimiotàctic a nivell pulmonar.

Un cop reclutats els neutròfils al pulmó, la lesió pulmonar es produeix per diferents mecanismes que inclouen l'alliberament d'enzims lisosomals i l'estrés oxidatiu mitjançant la generació de radicals lliures d'oxigen (RLO). La generació de RLO augmenta l'adherència entre els neutròfils i cèl·lules endotelials i és essencial per a la infiltració de les cèl·lules inflamatòries als espais alveolars. L'activitat dels neutròfils també està associada a l'activació del metabolisme de l'àcid araquidònic en la PA experimental, tant per la via de la ciclooxigenasa, com per la via de la lipooxigenasa que generen mediadors proinflamatoris.

Altres molècules involucrades en la relació neutròfils-endoteli són les molècules d'adhesió. La PA induïx un augment de l'expressió de la P-selectina en el pulmó mitjançant els RLO, per la via dependent de la XOD alliberada pel pàncrees danyat (Folch E i cols 1999). La participació de la XOD pancreàtica com inductora de la lesió pulmonar en la pancreatitis ha estat àmpliament estudiada. En les fases inicials de la PA, la XOD alliberada en la circulació sistèmica actua generant RLO i promovent el reclutament de neutròfils. L'especial sensibilitat dels pulmons als efectes de la XOD es deuen a la presència d'altres concentracions d'oxigen molecular lliure (no unit a l'hemoglobina, com ocorre a la sang) necessari per catalitzar les reaccions de la XOD (Granell S i cols 2004).

La lesió pulmonar durant la PA és un camp d'investigació en plena activitat on s'impliquen diversos mediadors de la inflamació i cèl·lules del sistema immunològic. Aquest fet explicaria perquè els intents terapèutics mitjançant el bloqueig d'un sol mediador han fracassat fins a data d'avui. Les qüestions de major importància en l'actualitat són esbrinar quins mediadors actuen com activadors de la resposta sistèmica i de quines cèl·lules són alliberats.

2.5.4 Implicació dels lípids en la pancreatitis aguda

Actualment es coneix que l'obesitat comporta un component inflamatori, caracteritzat per la infiltració de macròfags en el teixit adipós i per alteracions en la generació de citocines sintetitzades pels adipòcits (adipoquines). Aquesta producció de molècules amb efectes importants sobre la resposta inflamatòria porta a considerar el teixit adipós com un teixit, que en certes circumstàncies, pot potenciar la inflamació a òrgans distants.

En el teixit adipós, els adipòcits estimulats amb senyals proinflamatòries secreten reactants de fase aguda i mediadors de la inflamació com $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$, $IL10$, leptina, resistina o adiponectina, entre d'altres (Rajala MW i cols 2003). El teixit adipós, a més a més dels adipòcits, conté fibroblasts, preadipòcits, macròfags residents i cèl·lules endotelials.

En el cas concret de la relació entre la pancreatitis, la inflamació sistèmica i les alteracions en el teixit adipós, hi ha diversos estudis que suggereixen una relació. Per exemple, des de fa uns 25 anys se sap que l'obesitat empitjora el pronòstic en diferents malalties entre elles la PA. En diferents estudis fets amb pacients amb pancreatitis, s'ha observat que els malalts obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) tenen complicacions sistèmiques significativament més sovint i el nombre de criteris de Ramson respecte els pacients no obesos. Tot i això, en cap dels estudis s'ha observat que l'obesitat incrementi la mortalitat en la PA (Martinez J i cols 1999).

La literatura també descriu l'associació que hi ha entre les alteracions del metabolisme lipídic i la PA. Aquestes alteracions metabòliques dels lípids es presenten en forma de hipertrigliceridemia, amb menys freqüència en forma de hipercolesterolemia i amb un increment dels àcids grassos lliures en plasma. A

més, en models animals de PA, s'han descrit altes concentracions d'aquests àcids grassos lliures en l'ascítis que es genera durant aquesta malaltia. (Pappas TN i cols 1981).

La presència d'aquests àcids grassos està relacionada amb una alta activitat lipolítica present en el líquid ascític realitzada per la lipasa i fosfolipases alliberades per les cèl·lules acinars durant aquesta malaltia. Aquests enzims hidrolitzen triacilglicerols que produeixen monoacilglicerols i àcids grassos lliures que causen la necrosi grassa peritoneal, característica de les formes severes de la PA (Pappas TN i cols 1981). El destí metabòlic d'aquests àcids grassos podria ser la seva absorció per la vena porta i la reesterificació a triglicèrids pel fetge, contribuint així a la hipertrigliceridèmica associada a la PA (Balachandra S i cols 2006).

Recentment s'ha demostrat que aquests àcids grassos lliures alliberats a l'ascítis interfereixen en el mecanisme de regulació de les cèl·lules immunitàries. S'ha descrit que els àcids grassos poliinsaturats oxidats són altament tòxics en medi de cultiu (Cnop M i cols 2001). En diferents models experimentals de PA s'ha observat que el increment de lípids oxidats circulants activa NF- κ B (factor nuclear κ B) i augmenten els mediadors inflamatoris. A més a més, durant la pancreatitis poden actuar com a antagonistes del factor nuclear PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), reduint així la producció de mediadors anti-inflamatoris provocant un estat de inflamació prolongat.

Quan s'analitzen els nivells de lipoperoxidació, s'observa que hi ha un increment en el teixit adipós provinent d'animals amb pancreatitis respecte als animals control i que aquest increment és molt més important quan mesurem la lipoperoxidació d'àcids grassos del líquid ascític (Gutierrez PT i cols 2008). Probablement, els RLO generats per la XOD o el NADPH (nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduït) indueixen un moderat grau de lipoperoxidació en el teixit adipós. Pel contrari, els lípids presents en el líquid ascític estan sotmesos a un intens procés oxidatiu produint una alta concentració de lipoperòxids.

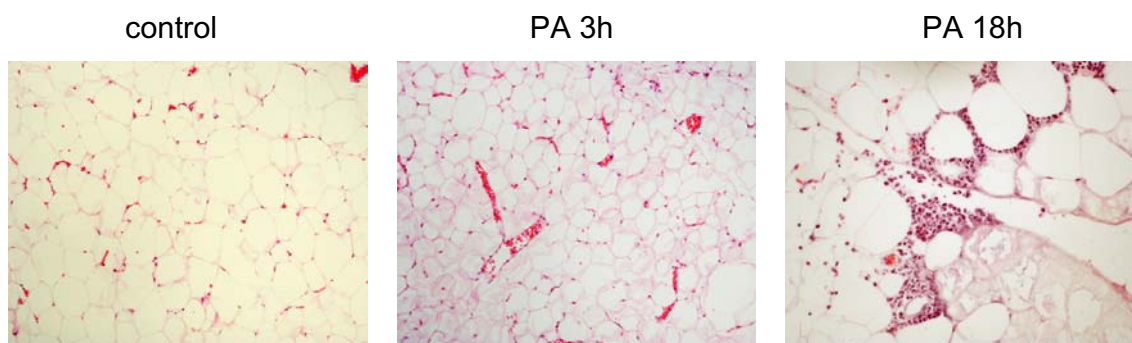


Figura 7: Augment de la infiltració de leucocits en el teixit adipós blanc durant la progressió de la PA. A les 18 h de PA, la necrosi grassa és molt important.

Per una altra banda, s'observa que la citotoxicitat induïda per la fracció lipídica del líquid ascític és més alta del que s'esperaria tenint en compte la concentració d'àcids grassos, suggerint que l'estat oxidatiu d'aquests lípids podria també jugar un paper important en el seu efecte tòxic. La implicació dels àcids grassos en la toxicitat del líquid ascític està confirmada per molt mecanismes deleteris activats durant la PA incloent enzims hidrolítics, mediadors inflamatoris, estrés oxidatiu i metabòlits lipídics. Malgrat tot, l'efecte biològic més important induït per aquests mediadors lipídics sembla estar en l'agreuament de la resposta inflamatòria.

2.5.5 Paper de NF- κ B

Diversos estudis han posat en evidència que el factor de transcripció NF- κ B juga un paper important en el desenvolupament d'aquesta malaltia, ja que és el responsable de regular la transcripció d'una gran varietat de gens involucrats en un procés inflamatori (Algul H. 2002).

Aquesta influència de la via de NF- κ B sobre la patogènia de la PA s'ha corroborat en diversos models experimental *in vivo*. La inducció d'una PA ja sigui per colecistoquinina, per citocines proinflamatòries o per RLO, es tradueix en tots els casos en una activació de NF- κ B en les cèl·lules acinars i en el pàncrees (Ramudo L i cols 2005). També es dona un augment en el nivells d'expressió de nombrosos mediadors inflamatoris incloent el TNF α , IL6 o MCP-1 (monocyte Chemokine Protein 1) tant en les cèl·lules acinars com en les cèl·lules inflamatòries (Gukovskaya AS i cols. 1997). Aquest fet suggereix que

l'activació de la via de NF- κ B és la principal responsable de la inducció de citocines proinflamatòries.

L'ús d'inhibidors de la via de NF- κ B s'associa tant a una disminució de la severitat de la PA, com a una reducció en els nivells d'expressió de diverses citocines proinflamatòries (Virlos I i cols 2003, Hashimoto K 2003). Tot i això, s'ha de tenir en compte que aquests inhibidors farmacològics tenen certes limitacions que inclouen el tipus cel·lular, la inhibició d'altres molècules i una elevada toxicitat.

2.5.6 Paper de PPAR γ

Fins ara hem vist diferents mecanismes proinflamatoris que ocorren durant la progressió de la PA com el dany originat a nivell de pàncrees, la generació de líquid ascític associat a aquesta malaltia i com d'altres òrgans i teixits com el teixit adipós van potenciant aquesta situació proinflamatòria. Però l'organisme té mecanismes de defensa els quals intentaran inhibir la inflamació, reparar el teixits i recuperar la seva normalitat.

Els mediadors lipídics de la inflamació són compostos de naturalesa lipídica amb baix pes molecular i activitat biològica. Les prostaglandines, leucotriens i PAF són exemples de mediadors lipídics generats durant la progressió de la PA (Closa D i cols 1994). Aquests mediadors actuen promovent tant el dany local com la resposta inflamatòria sistèmica. Tot i això, la seva importància en la progressió d'aquesta malaltia pareix estar limitada a quan comparem amb els efectes de les citocines alliberades durant la pancreatitis. Malgrat tot, hi ha mediadors lipídics que juguen un paper important en la regulació de la cèl·lula davant estímuls proinflamatoris. És àmpliament conegut que la funció dels macròfags i la seva expressió gènica està modulada per factors nuclears específics, i alguns d'aquests factors nuclears estan controlats per mediadors lipídics.

En particular, els PPAR són una superfamília de receptors hormonals nuclears, que per actuar com a factors de transcripció, requereixen activació per lligand i formar heterodímers amb RXR α (receptor X retinoide alfa), que és un altre

receptor nuclear (Desvergne B i cols 1999). Cal tenir en compte que PPAR també pot actuar com a homodímer en funció de la proporció entre PPAR i RXR en una determinada cèl·lula (Okuno M, i cols 2001). PPAR reconeix llocs de resposta a PPAR (PPRE) situats en els promotors dels seus gens diana i en modula l'activitat transcripcional, generalment augmentant-la però en el cas de les citocines proinflamatòries, la inhibeix.

PPAR γ és un dels membres de la família de PPAR que ha guanyat interès per participar en la modulació de la resposta inflammatòria (Rizzo G i cols 2006). La seva activació es fa mitjançant la unió a lligands lipídics, com alguns àcids grassos derivats del metabolisme. (Kliewer SA i cols 1997) La 15-d-PGJ₂ (15-deoxi- Δ (12,14)-Prostaglandina J₂) és un dels agonistes endògens més coneguts d'aquest factor nuclear, però hi ha altres àcids grassos oxidats i fosfolípids modificats que també podrien actuar com agonistes de PPAR γ . Per aquesta raó, els agonistes de PPAR γ són bons candidats com a teràpia antiinflamatòria per a diferents malalties, incloent la PA (Kliewer SA i cols 1997).

S'ha proposat la implicació de PPAR γ en la resposta inflammatòria del macròfag, ja que els activadors mostren efectes antiinflamatoris en estudis *in vitro* i *in vivo* (Jiang C i cols 1998; Desreumaux P i cols 2001). S'ha observat que PPAR γ pot interferir en diferents passos de la resposta inflammatòria que inhibiran l'expressió de molècules proinflamatòries secretades pels macròfags com el TNF α , l'IL-6 i l'IL-1 β . L'efecte sobre la resposta inflammatòria seria degut a mecanismes indirectes, ja que no s'han descrit PPRE en gens implicats en la resposta antiinflamatòria com en el gen proinflamatori. (Uchimura K i cols 2001) D'una banda, s'ha postulat que l'efecte podria ser el resultat d'una competició de PPAR γ activat per cofactors (Gelman L i cols 1999) que compartirien altres factors de transcripció com NF- κ B i AP-1 (Proteïna activadora-1), els quals regulen la transcripció de gens proinflamatoris com el TNF α (Collart MA i cols 1990). D'una altra, PPAR γ activat podria unir-se directament a subunitats d'aquests factors de transcripció. Ambdues accions bloquejarien l'efecte activador de NF- κ B i AP-1 sobre TNF α , que podria generar una inhibició de l'expressió de la citoquina proinflamatòria.

Experiments *in vitro* revelen que l'efecte inhibitori de la 15-d-PGJ₂ sobre el TNF α induït per l'activació de NF- κ B està bloquejat per els derivats lipídics del líquid ascític associat a la pancreatitis, aquest efecte no s'observa amb lípids obtinguts d'altres llocs com del teixit adipós blanc (TAB), suggerint que els lípids modificat presents en el PAAF actuen com a lligands del PPAR γ , interferint en l'activació normal d'aquest receptor nuclear (Gutierrez PT i cols 2008). La conseqüència d'aquesta interferència podria ser la pèrdua de mecanismes antiinflamatoris endògens.

L'efecte dels lípids derivats del PAAF el podem observar també en la unió de PPAR γ al DNA, ja que aquesta unió es veu reduïda en un 60 %. En canvi, els lípids obtinguts del TAB no afecten en presència d'aquests lípids aquesta unió. És interessant que l'habilitat de interferir amb l'activació de PPAR γ sembla correlacionar amb els nivells de lipoperoxidació. Aquest fet il·lustra la importància dels mecanismes enzimàtics endògens en la regulació dels nivells d'oxidació lipídica durant la PA.

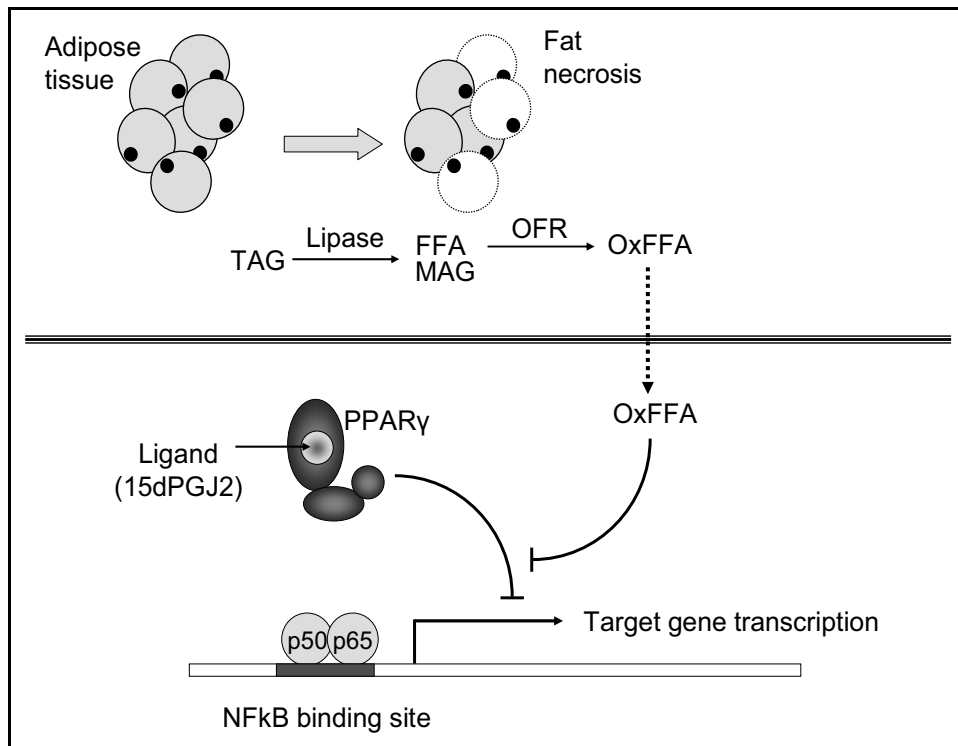


Figura 8: Lípids modificat presents en el PAAF actuen com a lligands del PPAR γ , interferint en l'activació normal de NF- κ B.

3. ELS MACRÒFAGS

3.1 Macròfags

Els macròfags són una de les poblacions cel·lulars més pleiotròpiques del sistema immunitari. Ells són els efectors de la resposta innata i estan involucrats en el inici i la regulació de les respostes adaptatives a través del processament i presentació antigènics, l'expressió de molècules co-estimuladores i la producció de citocines (Turpin JA 1993)

Els macròfags juguen un paper central en el desenvolupament de qualsevol resposta inflamatòria, incloent la PA. Tot i això, en el teixit pancreàtic les principals cèl·lules inflamatòries són els neutròfils infiltrats i els mastòcits residents, encara que també s'ha descrit la generació de citocines per part de les pròpies cèl·lules acinars pancreàtiques (Ramudo L i cols 2005).

L'activació dels macròfags sembla ser determinant en el desenvolupament de les lesions sistèmiques associades a la pancreatitis. Aquesta idea s'ha pogut demostrar en models experimentals gracies a la depleció d'aquestes cèl·lules amb diferents agents, com el bifosfonat de diclorometà o la carragenina i a l'ús de inhibidors relativament inespecífics. En concret, almenys tres poblacions diferents de macròfags presenten un major o menor grau d'activació: els macròfags peritoneals, les cèl·lules de Kupffer i els macròfags alveolars. (Folch E i cols 2000, Closa D i cols 1999) En el cas dels macròfags peritoneals i les cèl·lules de Kupffer, s'ha suggerit que contribueixen en la generació de citocines i d'altres mediadors inflamatoris, desencadenant la resposta inflamatòria sistèmica associada a la pancreatitis. Per una altra banda, els macròfags alveolars podrien ser decisius en l'establiment de la lesió pulmonar.

Els macròfags provenen dels monòcits que constitueixen entre el 5 i el 10 % dels leucòcits circulants en els éssers humans i, igual que les demés cèl·lules de sistema fagocític mononuclear, es caracteritzen per l'heterogeneïtat fenotípica i la seva capacitat d'adaptació en resposta a canvis microambientals (Gordon S 2007). Els processos de diferenciació dels monòcits donen lloc als

macròfags tissulars i les cèl·lules dendrítiques; tot i això, encara no es coneixen clarament les vies de senyalització, desenvolupament i diferenciació dels monòcits *in vivo*, responsables de la variabilitat de tipus cel·lulars originats.

Entre d'altres funcions, els monòcits contribueixen a la defensa de l'hoste i a la remodelació i reparació dels teixits (Gordon S. i Taylor PR 2005). Les subpoblacions de monòcits mostren diferències de grandària, morfologia i granularitat citoplasmàtica, així com patrons variables d'expressió de molècules de superfície (receptors scavenger, molècules d'adhesió, a més a més de receptors per a immunoglobulines i quimioquines).

Tot i que la vida mitjana dels macròfags en els teixits pot ser molt llarga (mesos o anys), molts dels macròfags que arriben als teixits acabaran desapareixent per un procés de mort cel·lular. En els teixits, un petit nombre de macròfags es diferenciarien sota la influència de citocines i, depenent del teixit, en cèl·lules de la micròglia en el sistema nerviós, en osteoblast de l'os, en histiòcits del teixit connectiu, en cèl·lules de Kupffer del fetge, en cèl·lules de classe A del teixit sinovial, en cèl·lules de Langerhans de la dermis o en cèl·lules dendrítiques, entre d'altres.

El terme macròfag va ser utilitzat per primera vegada per Elie Metchnikoff en 1893 (Metchnikoff E 1893) per a descriure un tipus de cèl·lula present en organismes vertebrats i invertebrats amb la capacitat de fagocitar microorganismes. A l'any 1924, Asschoff va classificar els macròfags dins del sistema reticuloendotelial, en el que va incloure a més a més, cèl·lules reticulars, endotelials, fibroblasts i monòcits. Posteriorment, els monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques van estar agrupades dins del sistema fagocític mononuclear, quan es va descobrir que aquests tipus cel·lulars tenien el seu origen en precursors del moll d'os. Tot i això, aquesta classificació ha estat discutida recentment, degut a noves dades en les investigacions que busquen determinar l'origen dels macròfags fetals i definir clarament quins són els precursors comuns entre macròfags i limfòcits (Gordon i Taylor, 2005).

Els macròfags juguen un paper molt important en el desenvolupament de la resposta immunitària en mamífers; entre les funcions de defensa que duen a terme, està la fagocitosi d'agents infecciosos com paràsits i bacteris, la regulació de l'activació i proliferació de limfòcits, així com la mediació en els processos inflamatoris (Elhelu MA 1983). A nivell morfològic i fisiològic, els macròfags comparteixen diferents característiques amb altres cèl·lules del sistema fagocític mononuclear com l'activitat endocítica, l'expressió d'esterases no específiques i hidrolases lisosomals, la capacitat de fagocitar de manera no específica partícules col·loïdals i la presència de receptors per a la fracció cristal·litzable de les immunoglobulines i de certs factors del sistema de complement (Hume DA 2006).

3.2 Origen i diferenciació de macròfags.

El procés de formació de macròfags i cèl·lules dendrítiques en l'humà adult s'inicia amb la diferenciació de cèl·lules mare hematopoètiques pluripotencials residents en el moll d'os, la melsa i el fetge fetal que donen lloc a cèl·lules progenitores del llinatge fagocític mononuclear. El procés de diferenciació continua en el moll d'os, on els progenitors van assolint progressivament els estats de monoblasts, promonòcits i monòcits. Tradicionalment, s'ha considerat que els monoblasts són les cèl·lules amb major activitat mitòtica en el llinatge, mentre que la divisió de promonòcits i la proliferació local de macròfags madurs són mecanismes de menor importància per al manteniment del nombre de macròfags tissulars residents (Hume DA i cols 2002). Encara que estudis recents mostren evidències de que els macròfags tissulars poden derivar de la proliferació local més que dels monòcits perifèrics reclutats (Merad M i cols 2002, Gordon S and Taylor PR 2005).

Els monòcits abandonen el moll d'os, entren a la circulació sanguínia i arriben als teixits on continuen el seu procés de maduració fins a originar els macròfags i cèl·lules dendrítiques. Existeix una gran diversitat de factors que condicionen la diferenciació dels monòcits en macròfags o cèl·lules dendrítiques. El paper principal se li ha atribuït a factors de creixement de la família de les glicoproteïnes CSF (Colony Stimulating Factors), les quals estimulen el creixement i la diferenciació de les cèl·lules del llinatge hematopoètic. Estudis

in vitro en línies cel·lulars com les THP-1 i U-937 i monòcits aïllats de sang perifèrica han demostrat que la diferenciació de monòcits a macròfags funcionals es produeix en resposta a l'estímul per M-CSF (Macrophage-CSF o CSF-1) o GM-CSF (granulocyte-macrophage CSF) i IL4 (Bender AT i cols 2004; Chomarat P i cols 2000).

Durant la diferenciació de monòcits a macròfags s'ha descrit un augment en l'expressió de gens relacionats amb la regulació de la resposta immune, el metabolisme de lípids, àcids grassos i esteroides, l'adhesió cel·lular, el metabolisme de carbohidrats i aminoàcids i l'endocitosi; per una altra banda s'ha descrit la disminució global en l'expressió de diferents factors de transcripció (Martinez FO i cols 2006), encara que factors com C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein alpha) i IRF-7 (Interferon Regulatory Factor 7) augmenten el seu nivell d'expressió durant el procés de diferenciació (Lu i cols 2001). Altres mecanismes que poden participar en la diferenciació dels monòcits són l'activació de caspases 8, 9 i 3 en monòcits estimulats amb M-CSF (Bender AT i cols 2004), la presència de IL6, la qual polaritza la diferenciació de monòcits a favor dels macròfags en lloc de cèl·lules dendrítiques (Chomarat P 2000), l'activació de TLR (Toll-like Receptor) i l'expressió de DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin) fet que ha estat relacionat amb la diferenciació de monòcits en macròfags fagocítics i d'activitat antimicrobiana (Krutzik SR 2005).

Els monòcits activats expressen major quantitat de molècules MHCII (Major Histocompatibility Complex Class II) i CD32 (conegut també com Fc γ RII), cosa que els fa similars als macròfags tissulars madurs. Per una altra banda, el nombre de monòcits activats s'incrementa durant les infeccions. Els monòcits activats produeixen nivells alts de TNF α i nivells baixos de IL-10 quan són activats per agonistes dels TLR, pel que s'anomenen monòcits proinflamatoris (Serbina NV i cols 2008). Tot i això, no s'ha aclarit quin paper juga l'heterogeneïtat de les poblacions de monòcits en la generació de les diferents poblacions de macròfags o quines són les característiques dels precursors circulants que donen origen específicament a macròfags, cèl·lules dendrítiques i osteoclasts (Gordon S i Taylor PR 2005; Mosser DM i cols 2008).

Un cop diferenciats, els macròfags són activats per una varietat d'estímuls en el curs de la resposta immunitària. Aquesta elevada heterogeneïtat fenotípica i funcional dels macròfags està condicionada pel medi extracel·lular i ha portat a la definició d'estats d'activació (clàssica, alternativa) en la que els macròfags mostren activitats funcionals molt diverses i fins i tot oposades. La base molecular d'aquesta heterogeneïtat funcional ha començat a aclarir-se per l'anàlisi dels perfils d'expressió gènica i les funcions efectores dels macròfags en diferents situacions patològiques.

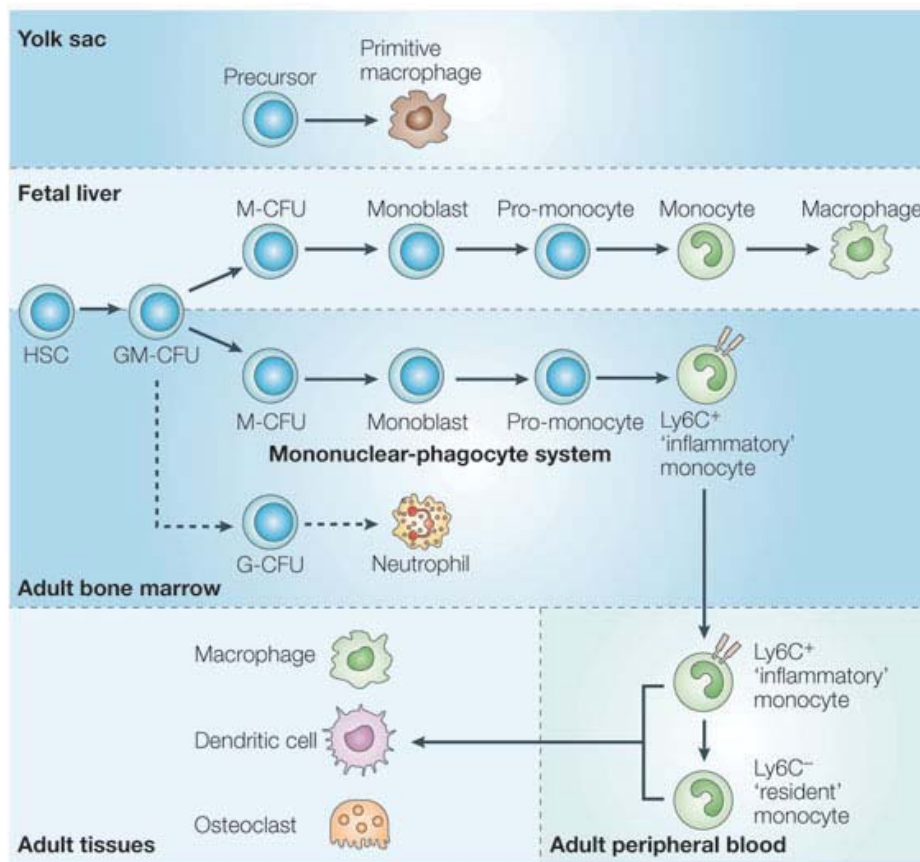


Figura 9: Origen i diferenciació dels macròfags. Llinatge mieloid. (Gordon S i Taylor PR 2005)

3.3 Activació dels macròfags

En el passat, els macròfags s'identificaven com a cèl·lules purament inflammatòries (macròfags activats clàssicament), amb capacitat de secretar mediadors inflamatoris, fagocitar i actuar amb cèl·lules presentadores d'antigen i matar patògens intracel·lulars.

Els macròfags estan equipats amb un ampli rang de molècules que detecten alteracions en l'estructura dels teixits o les seves funcions, DAMP (Damage-Associated Molecular patterns) i alteracions exògenes, PAMP (Pathogen-Associated Molecular patterns). Exemples d'aquestes molècules detectores d'alteracions serien: els TLR, els receptors NOD-like (NLR), lectines i receptors de citocines (Greagh EM i cols 2006; Vega MA i cols 2006). Tot i això els macròfags també poden regular el procés inflamatori participant en la seva resolució. Últimament s'han descrit molts exemples que demostren l'habilitat que tenen els macròfags en parar les reaccions inflamatòries, emfatitzant en el concepte d'activació alternativa (Stein M i cols 1992) oposada a l'activació clàssica.

Actualment es parla de diferents estats d'activació, entre els que es troben el clàssic i l'alternatiu. Tot i això, encara no està del tot clar quins són els inductors, les propietats funcionals i el repertori molecular de cadascun d'aquests grups de macròfags. Per analogia de la polarització dels limfòcits T en Th1/Th2, l'activació dels macròfags en resposta a estímuls patogènics, senyals de dany endògenes i/o citocines tipus I (INF_{γ} , TNF_{α}) ha estat anomenada activació clàssica o M1. Anys més tard, es van descobrir uns macròfags no clàssics, induïts per citocines provinents de limfòcits Th2 (IL4, IL13 i IL10) que bloquejaven o revertien l'activació clàssica i participaven en la reparació del teixit. En contraposició als macròfags clàssics, aquest nou fenotip va rebre el nom d'activació alternativa o M2. (Varin A i Gordon S. 2009)

Els macròfags activats clàssicament (M1) induïts per interferó gamma (INF_{γ}) i/o TNF_{α} mostren un fenotip tipus Th1, són efectors proinflamatoris i tenen funcions bactericides. Els macròfags activats alternativament (M2), que inclou com a mínim tres fenotips diferents solapats (M2a, M2b, M2c) mostren un fenotip tipus Th2 i estan involucrats en la resolució de la inflamació i la reparació del teixit. Encara que aquest model classifica els fenotips d'activació més extrems, és important considerar que subestima la complexitat *in vivo*, on existeix una alta diversitat d'estats de macròfags activats que apareixen en resposta a diferents estímuls i ambients, són influenciats per la seva heterogeneïtat i conformen un "seguit" d'activació. (Mantovani A i cols 2004)

La via d'activació clàssica pot estar induïda en un cultiu de macròfags per la presència de INF_{γ} i LPS, o citocines com GM-CSF, el que genera la producció de IL12, IL13, RLO i NRI (Nitrogen Reactive Intermediates). Aquesta via s'associa amb activitat antimicrobiana, producció de citocines proinflamatòries (IL1 β , TNF α , IL6,..) i immunitat cel·lular (Gordon S 2003). En alguns casos, es necessita una senyal conjunta entre el INF_{γ} i LPS (lipopolisacàrid bacteria) per a l'activació d'aquesta població de macròfags. Altres inductors d'aquesta via són alguns agonistes del TLR que tenen capacitat d'induir tant el TNF α com INF_{γ} (Mosser DM i Edwards JP 2008).

Activació de macròfags

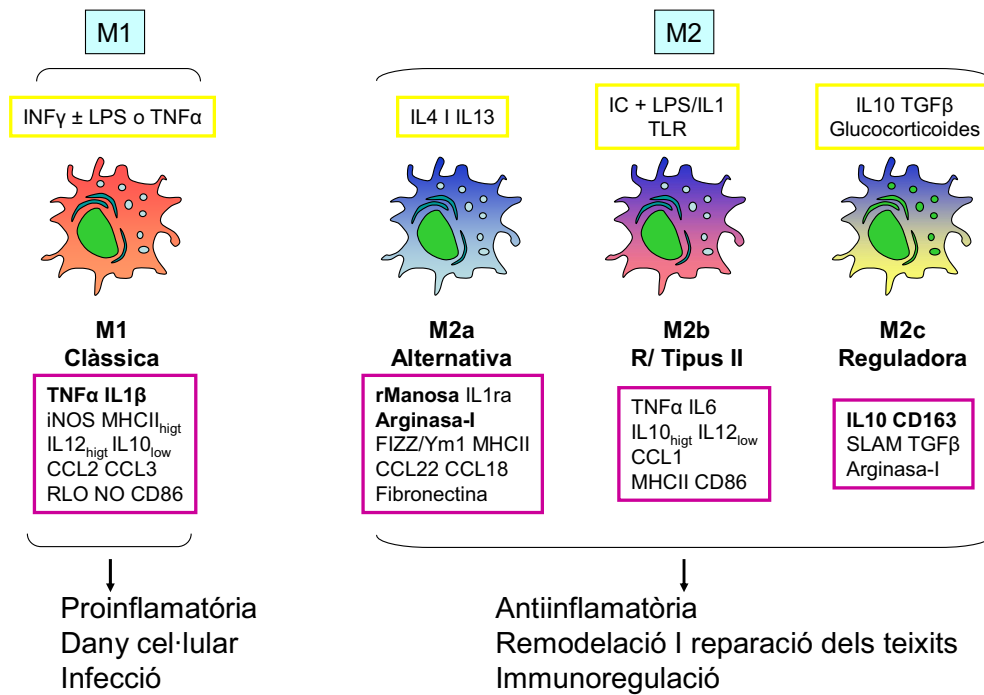


Figura 10: Esquema de l'activació dels macròfags.

Per una altra banda, la via alternativa d'activació es produeix en macròfags cultivats en presència de IL4 o IL13, complexos immunitaris o vitamina D entre d'altres i origina un augment dels nivells d'expressió de receptors scavenger i receptors de manosa i galactosa. Aquesta via està associada amb la reparació tissular i el desenvolupament de la resposta immune humoral (Edwards JP i cols 2006; Martinez FO i cols 2006). Alguns autors reconeixen una via

d'activació innata, que es produeix per la unió de lligands als receptors TLR i, al igual que la via clàssica es relaciona amb activitat antimicrobiana i producció de citocines proinflamatòries (Serbina NV i cols 2008). La inhibició dels macròfags en cultiu pot donar-se en presència de citocines com la IL10 o TGF β (Factor transformador de creixement β), o per la unió de lligands a receptors com CD200 o CD172a. Aquesta inhibició està associada amb la producció de citocines antiinflamatòries i amb la reducció en l'expressió de molècules MHC-II (Gordon S i Taylor PR 2005). El perfil fagocític i secretori dels macròfags pot ser modificat addicionalment per moltes altres senyals provinents tant de les mateixes cèl·lules com dels patògens (Mantovani A i cols 2005; Martinez FO i cols 2008; Mosser DM i cols 2003).

3.4 Mecanismes moleculars que regulen l'activació dels macròfags.

L'activació dels macròfags, tant clàssica com alternativa, és un procés complex i finament regulat que consisteix en una sèrie de modificacions morfològiques i bioquímiques, que augmenten la capacitat de la cèl·lula per exercir les seves funcions fisiològiques.

3.4.1 Activació clàssica

Aquest macròfags tenen la capacitat d'activar mecanismes efectors com la mort de paràsits intracel·lulars, lisi de cèl·lules tumorals, producció i secreció de mediadors proinflamatoris com IL1 β , IL6, IL12, TNF α , CCL3 (quemoquina), CXL9 i CXL10, producció de RLO, activació de l'enzim iNOS (òxid nítric sintasa induïble) i generació de NO (òxid nítric), augment de l'expressió de MHCII, CD86 i la presència antigènica associada amb les cèl·lules Th1 (Katakura T, 2004; Mantovani A, 2002).

Davant d'un estímul inflamatori, els macròfags comencen a diferenciar-se i activar mecanismes moleculars que indueixen les seves funcions. Per una banda, fagociten els cossos estranys que entren a l'organisme, com els bacteris, pol·lució, i restes cel·lulars o moleculars dels teixits. Una vegada fagocitats, els processen i fan una presentació antigènica per als limfòcits. Per una altra banda, s'indueix la producció de citocines, RLO, aquesta producció de mediadors proinflamatoris està dirigida per l'activació d'una sèrie de vies de

transducció de senyal com les vies de les molècules STAT i les MAPKs que acaben activant factors nuclears com NF- κ B i induint l'expressió de mediadors inflamatoris. (Mosser DM i cols 2008)

La reacció inflamatòria característica d'aquest macròfags M1 es considera una resposta fisiològica protectora, sempre que es mantingui localitzada en la zona afectada per una lesió/infecció. Redueix la viabilitat dels microorganismes i incrementa la resposta davant restes cel·lulars; activa tota una cascada d'altres mediadors proinflamatoris i atrau a altres leucocits. Ara bé, si aquests macròfags presenten una activació desmesurada, alliberant els seus mediadors pro-inflamatòris al torrent circulatori, pot generar-se a una resposta sistèmica exagerada que pot afectar a òrgans distants.

3.4.2 Activació alternativa

En la última dècada s'han descrit molts exemples de l'habilitat que tenen els macròfags per aturar una reacció inflamatòria i desenvolupar funcions oposades a la idea clàssica de l'activitat dels macròfags. Aquesta nova via, anomenada resposta alternativa o M2, per oposició a la fins al moment coneguda com clàssica o M1, participa en processos antiinflamatoris i de reparació de teixits.

Aquest macròfags comparteixen propietats funcionals involucrades en respostes tipus II, com la immunoregulació i remodelació del teixit, o el control dels paràsits extracel·lulars (helminths, protozous, fongs). També contribueixen en patologies com les al·lèrgies i asma i participen en processos de fibrosi. Fins al moment, no s'ha consolidat una definició clara de l'activació alternativa degut a que s'ha observat que els efectes de la IL4 en la generació d'un fenotip alternatiu se solapa de manera parcial amb els induïts per la IL13, IL10, glucocorticoides i TGF β (Mosser DM, 2003).

Mantovani i els seus col·legues proposen una classificació per definir alguns d'aquests fenotips no clàssics basada en els estímuls que les indueixen. En aquesta classificació els macròfags estimulats per les citocines tipus Th2, IL4 i IL13 s'anomena M2a, els macròfags activats per immunocomplexes i alguns

l·ligands dels TLR rep el nom de M2b i els macròfags activats per la presència de IL10, glucocorticoids i TGF β , és la M2c. (Mantovani A i cols 2004)

La resposta **M2a** està induïda per la IL4 i IL13. La unió d'aquestes citocines activa la via de STAT6, la seva fosforilació, dimerització, translocació al nucli i activació transcripcional (Hershey GK 2003; Hebenstreit D i cols 2006). STAT6 actua segrestrant molècules coactivadores de STAT1 i NF- κ β , suprimint així l'activació de gens induïts per LPS i INF γ (Hamilton TA i cols 2002).

La IL4 i IL13 estimulen també, l'expressió en membrana i l'activitat de receptors no opsònics com el receptor de la manosa (MR) (Montaner LJ i cols 1999; Stein M i cols 1992), però regulen negativament l'expressió de CD163, afavorint el reconeixement de carbohidrats dels microorganismes i disminuint el de cossos apoptòtics. També regulen positivament l'expressió de CCL2 i la CCL13. La producció d'aquest grup de quemoquines específic s'associa amb la resposta Th2 i amb el reclutament de leucocits involucrats en la remodelació i reparació del teixit, al·lèrgia, resistència a helmints i progressió de tumors (Mantovani A i cols 2004).

En el metabolisme dels lípids, la IL4 i IL13 són moduladores positives de la 15-lipooxigenasa que afavoreix l'expressió d'òxid nítric sintasa (NOS2) i la producció de l·ligands per al PPAR γ , receptor involucrat en la inhibició de la secreció de citocines proinflamatòries (Jiang C i cols 1998; Ricote M i cols 1998). Aquestes citocines també estimulen l'expressió de l'arginasa1 (Arg1), fent que es consumeixi el substrat de NOS2 de manera que s'inhibeix la generació de NO (Bronte V i cols 2003; Corraliza IM i cols 1995). Els macròfags productors de Arg1 participen en processos de reparació tissular, fibrogènics, en la síntesi de col·lagen i poden tenir accions anti-inflamatòries mitjançant la producció de poliamines que inhibeixen l'expressió de NOS2 i la síntesi de citocines proinflamatòries. (Raes G i cols 2005)

El fenotip **M2b** es genera per l'exposició a immunocomplexos (molècules opsonitzades amb IgG) i alguns l·ligands dels TLR com LPS. Els macròfags M2b presenten una alta expressió de IL10 i baixa de IL12. També expressen alts nivells de molècules MHC II i no expressen arginasa 1 i participen en el

reclutament selectiu dels linfòcits T reguladors (Treg) (Mantovani A. i cols 2004).

Aquests macròfags es caracteritzen per promoure la diferenciació Th2 i les patologies relacionades amb aquesta polarització com l'asma, al·lèrgies, infeccions per helmints i encapsulament de paràsits. Estudis en murins han demostrat que existeix més semblança entre els fenotips M1 i M2b que entre els M2a i M2c. La fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques pot generar macròfags M2b (Savill J i cols 2002).

La IL10, el TGF β i els glucocorticoides es consideren molècules inductores del fenotip **M2c**. Aquest fenotip participa sobretot en mecanismes immunoreguladors, "desactivant" l'activació M1. IL10 inhibeix la producció de citocines proinflamatories, l'alliberament de NO i RLO i les activitats antimicrobianes dels macròfags M1 (de Waal MR i cols 1991). Els glucocorticoides antagonitzen la producció de IL6, IL1 β , TNF α i PEG2 i sineritzen amb IL4 en aquesta inhibició (Cheung DL i cols 1990).

Aquests macròfags presenten una baixa expressió de MHC II, tenen atenuada la presentació antigènica (Berrebi D i cols 2003), regulen positivament de CD163 (Schaer DJ i cols 2002) i també regulen l'expressió dels gens Arg1 i IL4R α . Estan involucrats en la remodelació de la matriu extracel·lular i del teixit i tenen incrementada l'activitat endocítica i fagocítica.

Encara que els patrons d'expressió genètica induïts per cadascun dels inductors alternatius són substancialment diferents, els efectes supressors comuns dels glucocorticoides, IL10, IL4, i IL13 en l'expressió de citocines Th1, la inflamació i l'activació immunitària poden ser explicats en part per la regulació negativa de les accions de NF-k β i STAT1.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Malgrat els esforços dedicats a investigar la PA, segueixen sense resposta la major part de les preguntes plantejades fa anys. En particular, encara no es coneixen tots els mecanismes pels que una lesió localitzada en el pàncrees pot induir una afecció en òrgans distants, com el pulmó.

Durant els últims anys s'ha pogut establir que l'activació de les cèl·lules inflamatores juga un paper central en el desenvolupament d'aquesta malaltia. Per una altra banda, els macròfags poden presentar diferents fenotips en funció del tipus d'activació a la que es veuen sotmesos, destacant l'activació clàssica (induïda per $INF\gamma$) i l'alternativa (induïda per citocines com IL4, IL13, IL10, glucocorticoids..). Aquests tipus d'activació podrien condicionar la progressió de la pancreatitis cap a formes lleus o severes.

En aquesta tesi s'ha avaluat el tipus d'activació que presenten diferents poblacions de macròfags i la seva relació amb la severitat del procés (lleu, moderada o severa). El treball s'ha realitzat a nivell experimental *in vivo*, utilitzant un model de PA per infusió de sals biliars. També s'ha analitzat la resposta de les diferents poblacions de macròfags als estímuls generats durant la pancreatitis i s'ha treballat sobre aquests macròfags amb la finalitat de modificar la via d'activació que presenten i ,amb això, modular el procés inflamatori sistèmic associat a la PA.

La hipòtesi de partida és que el tipus d'activació de les diferents poblacions de macròfags implicats en la pancreatitis aguda condiona l'evolució i la severitat de la malaltia. Actuant sobre el tipus d'activació de diferents poblacions de macròfags es podria modificar el curs de la malaltia de severa a lleu.

Així doncs els objectius concrets d'aquest treball serien:

1. Obtenir i caracteritzar el tipus d'activació presentat per els macròfags peritoneals i pulmonars durant el desenvolupament de la pancreatitis aguda. Correlacionar el tipus d'activació de les diferents poblacions de macròfags amb el grau de severitat de la patologia.
2. Avaluat el paper de les diferents vies de senyalització intracel·lular implicades en el fenotip dels macròfags.
3. Determinar els possibles mediadors implicats en l'activació dels macròfags durant la pancreatitis aguda.

MATERIALS I MÈTODES

1 ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

1.1 Animals d'experimentació

Els animals d'experimentació utilitzats van ser rates (*Rattus norvegicus*) de la soca Wistar (Charles River, França) mascle de 250-300 g de pes corporal. L'estabulació es va fer sota condicions ambientals constants de temperatura (22-24 °C) i humitat relativa del 70 % amb cicles llum fosc de 12 hores. L'alimentació, consistent en pinso AO4 Panlab (Barcelona) i aigua de la xarxa de Barcelona, es van subministrar *ad libitum*. Tots els estudis es van realitzar d'acord amb les directrius de la Unió Europea per models d'experimentació animal (86/609/CEE 24 Novembre 1986) i amb l'aprovació del comitè ètic per l'experimentació animal.

1.2 Model experimental

En aquesta tesi, ens hem centrat en l'estudi dels efectes sistèmics i fallida multiorgànica associats a la pancreatitis aguda severa. Hem escollit un model experimental de pancreatitis aguda severa amb l'administració intraductal d'una sal biliar, ja que reproduceix uns efectes sistèmics i fallida multiorgànica comparables amb les pancreatitis agudes severes en humans.

El model experimental de pancreatitis aguda severa es basa en l'efecte detergent de les sals biliars com el taurocolat sòdic. A l'administrar intraductalment el taurocolat sòdic, aquest provoca la destrucció de membranes cel·lulars del pàncrees i el trencament dels grànuls de secreció, destruint completament l'òrgan però mantenint la seva integritat. És un model que permet modular la inducció de les lesions inflamatòries a través de la concentració de les substàncies injectades.

Vam anestesiàr els animals amb l'administració intraperitoneal de pentobarbital sòdic (50 mg/kg). La inducció de la pancreatitis s'ha fet segons el mètode descrit inicialment pel grup d'en H.J. Aho (Aho HJ i cols en 1980) que provoca una pancreatitis aguda necrotitzant. Aquest mètode consisteix en practicar una laparotomia mitja i exposar la part duodenal de la glàndula pancreàtica. Amb una agulla, es fa un orifici al duodé per introduir una cànula de 0.28 mm de

diàmetre intern que es situa a la part proximal del conducte biliopancreàtic. La part distal del conducte es tanca amb un clamp vascular per evitar el pas de la solució a administrar cap al fetge. Mitjançant una bomba de perfusió (Harvard Instruments, Edenbrigde, Regne unit) s'administra, sota flux constant, una solució de taurocolat sòdic al 3.5 o 5 % (Sigma, St Louis, MO, Estats Units) a una dosi de 0.1 ml/100 g de pes corporal i una velocitat de 0.3 ml per minut. En els grups control es va administrar solució salina (NaCl 0.9 %). La concentració de taurocolat sòdic al 5 % indueix una pancreatitis aguda severa que desenvolupa una lesió pulmonar important a les 3 h de la inducció, provocant la mort de l'animal a les 24 h en el 100 % dels casos.

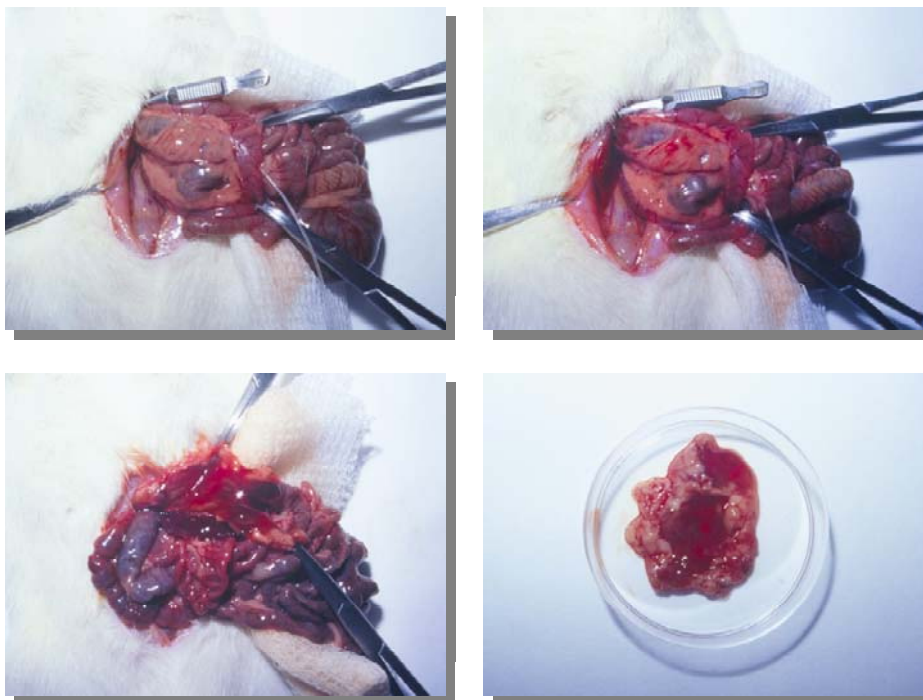


Figura 11: Model experimental de PA amb Taurocolat sòdic: Canulació del conducte biliopancreàtic a través de la papil·la de Vater. Administració del taurocolat sòdic. Aspecte del pàncrees a les 3 h després d'induir PA. Pàncrees hemorràgic, amb edema i necrosi.

2 DISSENY EXPERIMENTAL

Estudi 1

Experiment 1.1

Per caracteritzar el fenotip que adoptaven els macròfags peritoneals durant la progressió de la PA es van realitzar els següents grups experimentals:

- Grup control (n=6): Administració intraductal de solució salina.
- Grup pancreatitis 3 (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 5 % i sacrifici a les 3 h.
- Grup pancreatitis 18 h (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 5 % i sacrifici a les 18 h.

L'activació dels macròfags peritoneals es va analitzar per PCR a temps real, amb els marcadors: TNF α per l'activació clàssica o M1 i el receptor de la manosa per l'activació alternativa o M2. El dany pancreàtic es va mesurar amb els nivell de lipasa en plasma. Els efectes sistèmics es van avaluar com activitat mieloperoxidasa (MPO) en teixit pancreàtic, pulmonar i adipós blanc a les 3 i 18 hores d'haver induït la malaltia.

Experiment 1.2

Per intentar revertir l'activació dels macròfags activats durant la pancreatitis, primer es va realitzar un experiment *in vitro*. Per aquest experiment es van obtenir macròfags peritoneals d'animals amb PA al 5% i 18 h de malaltia i d'animals control. Van incubar aquests macròfags amb una barreja de IL4 i IL13 (10 ng/ml de cada una) durant 24 h. Després d'aquest temps vam obtenir el RNA dels macròfags, utilitzant TRIzol® i vam analitzar l'expressió dels marcadors d'activació per PCR a temps real. L'experiment es va realitzar per triplicat.

D'altra banda, per veure la reversió *in vivo*, es van realitzar els següents grups experimentals:

- Grup control (n=6): Administració intraductal de solució salina
- Grup pancreatitis 3 h (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 5 % i sacrifici a les 3 h.
- Grup pancreatitis 3 + IL4/13 (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 5 %. 1 h després, administració intraperitoneal de la barreja de interleuquines 4 i 13 (4 µg/ kg de cada una). El sacrifici dels animals es va fer a les 2 h del tractament, es a dir, a les 3 h de la inducció de la PA.

L'activació dels macròfags peritoneals es va analitzar per PCR a temps real, amb els marcadors: TNF α per l'activació clàssica o M1 i el receptor de la manosa per l'activació alternativa o M2. Per veure els efectes d'aquest tractament, igual que en l'experiment 1.1, es va analitzar el dany pancreàtic i els efectes sistèmics amb la lipasa en plasma i l'activitat mieloperoxidasa en teixit pancreàtic, pulmonar i adipós blanc respectivament.

Finalment, per avaluar l'efecte dels enzims hidrolítics presents en el líquid ascític sobre el tractament amb interleuquines, vam incubar IL4 en presència de líquid ascític o plasma, durant diferents temps (30 min, 1h i 2h). Vam mesurar per ELISA la concentració d'aquesta citoquina. L'experiment va estar realitzat per triplicat.

Estudi 2

Experiment 2.1

Per caracteritzar el fenotip que adopten els macròfags alveolars i intersticials del pulmó durant la progressió de la PA es van realitzar els següents grups experimentals:

- Grup control (n=6): Administració intraductal de solució salina.
- Grup pancreatitis 3 h (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 3.5 % i sacrifici a les 3 h.
- Grup pancreatitis 6 h (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 3.5 % i sacrifici a les 6 h.
- Grup pancreatitis 24 h (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 3.5 % i sacrifici a les 24 h.

Per veure que realment hi havia dues poblacions diferents de macròfags al pulmó, vam realitzar immunohistoquímiques contra l'antigen ED1 (mouse anti-rat CD68) per que els macròfags alveolars són més positius i contra ED2 (mouse anti-rat CD163) per al qual els macròfags intersticials són més positius (Dijkstra CD i cols 1985).

Després d'obtenir els macròfags alveolars i intersticials, es va extraure el RNA amb TRIzol® per avaluar l'expressió dels següents marcadors d'activació.

Via d'activació	Marcadors
Clàssica o M1	TNF α i IL1 β
Reparadora o M2a	Rec manosa i Arginasa-I
Reguladora o M2c	IL10 i CD 163

Per veure les vies de senyalització intracel·lular que estaven implicades en els diferents fenotips, un cop els macròfags en cultiu, vam extraure la proteïna citoplasmàtica i nuclear. Seguidament, per *western blot* van mesurar els nivells de I κ B al citoplasma, indicador de l'activitat de NF- κ B i la unió de PPAR γ al DNA amb un kit d'ELISA, indicatiu d'un PPAR γ activat.

Experiment 2.2

Per veure si les diferències observades en el fenotip dels macròfags alveolars i intersticials eren degudes a la diferent localització d'aquests macròfags en el pulmó, vam incubar *in vitro* aquests macròfags amb medi en presència de

rentat broncoalveolar d'una rata amb PA 5 %, 3h. Per avaluar la resposta dels macròfags a aquest estímul vam mirar l'expressió del gen TNF α .

Estudi 3

Experiment 3.1:

Per examinar la importància del teixit adipós com a font de mediadors inflamatoris durant la pancreatitis induïda amb taurocolat en rates, vam fer els següent grups experimentals:

- Grup control (n=6): Administració intraductal de solució salina.
- Grup pancreatitis 18 h (n=6): Administració intraductal de taurocolat sòdic al 5 % i sacrifici a les 18 h.

Després de 18 h de la inducció de la PA, vam obtenir mostres de teixit adipós blanc d'animals control i d'animals amb PA, separant en aquest cas en zones amb necrosi i sense necrosi i vam mesurar la MPO, per avaluar l'estat inflamatori.

Part d'aquest teixits es van digerir amb TRIzol® per avaluar l'expressió de gens induïts per la inflamació. També es van obtenir mostres de teixit amb formol per fer histologies i immunohistoquímiques.

Experiment 3.2:

Per estudiar el paper que té el teixit adipós com a font de mediadors inflamatoris i l'efecte d'aquests sobre els macròfags, vam fer el següent:

Primer vam incubar durant 24 h explants de teixit adipós blanc d'animals control i teixit adipós blanc d'animals amb PA diferenciant entre les zones sense necrosi i zones amb necrosi. Després d'aquest temps vam mesurar els nivells NO₂⁻ i els lipoperòxids (TBARs).

Seguidament, vam avaluar la capacitat d'aquests mediadors, generats pel teixit adipós, per activar els macròfags. Vam incubar amb aquest medi condicionat amb macròfags peritoneals de rates basals. Per PCR real time vam avaluar l'expressió de TNF α . L'experiment va estar realitzat per triplicat.

Experiment 3.4

Per estudiar si la necrosi grassa, pot alliberar aquests mediadors a la circulació sistèmica vam fer el següent experiment: Després de induir PA a 18 h, vam buscar una part de mesenteri que tingues vasos sanguinis envoltats de necrosi grassa i d'altres que no tinguessin necrosi. En un experiment *ex vivo*, vam extreure el paquet intestinal, vam canular la vena mesentèrica i vam perfondre el teixit amb salí. Després, vam treure la part de l'intestí i vam recollir l'eluat dels vasos sanguinis distingint entre aquells que presentaven necrosi i dels que no en presentaven.

Els diferents eluats vam mesurar, com a exemple de mediador proinflamatori, la quantitat de TNF α amb un ELISA. L'experiment va estar realitzat per triplicat.

3 MÈTODES

3.1- Aïllament i cultiu de Macròfags:

3.1.1 Aïllament i cultiu de Macròfags Peritoneals:

Per l'aïllament de macròfags peritoneals vam fer 5 rentats peritoneals de 10 ml de PBS amb heparina. Després de fer els rentats, els centrifuguem i resuspenem les cèl·lules amb medi de cultiu RPMI 1640, suplementat amb *fetal calf serum* al 10 %, 2 mM de glutamina, penicilina (100 U/ml) i streptomicina (100 μ g/ml). Les cèl·lules es van incubar 2 h per a que s'adhereixin. La selecció dels macròfags alveolars es fa rentant les cèl·lules en suspensió i seleccionant les cèl·lules adherides a la placa, obtenint una puresa del 85 %.

3.1.2 Aïllament i cultiu de Macròfags Alveolars:

Per l'aïllament de macròfags alveolars hem seguit un protocol que consisteix amb extraure la tràquea i els pulmons i realitzar entre 5 i 10 rentats broncoalveolars de 10 ml de PBS fred. Un cop recollit el rentat, el centrifuguem i incubem les cèl·lules en una placa de cultius amb medi RPMI 1640, suplementat amb *fetal calf serum* al 10 %, 2 mM de glutamina, penicilina (100 U/ml) i streptomicina (100 μ g/ml), durant 2 h, per deixar que s'adhereixin. La

selecció dels macròfags alveolars es fa rentant les cèl·lules en suspensió i seleccionant les cèl·lules adherides a la placa, obtenint una puresa del 95 %.

3.1.3 Aïllament i cultiu de Macròfags Intersticials del pulmó:

Per l'aïllament de macròfags intersticials del pulmó hem utilitzat una modificació del mètode descrit per A. Serrano-Mollar (Serrano-Mollar A i cols 2007). Aquest mètode consisteix en extraure la tràquea i el pulmó dels animals i fer, com a mínim, 10 rentats broncoalveolars de 10 ml de PBS, per extraure el màxim nombre de macròfags alveolars. Tot seguit, digerim el pulmó amb una solució de tripsina (T8003, Sigma) al 25% en salí, suspès en salí, a 37 °C. durant 30 min. Després de la digestió, els pulmons són trossejats en fragments de 1-2 mm³ i tractats amb DNAsa diluïda 7500 U/100 ml en salí. Filtrem el disgregat per diferents filtres de nylon d'un porus entre 150 i 30 µm. La suspensió cel·lular que tenim la centrifuguem amb un gradient de Percoll 250 g 20 min a 10 °C. Seleccionem la banda rica en monòcits i la tractem amb DNAsa diluïda 2000 U/ ml 5 min. Finalment centrifuguem aquestes cèl·lules 1000 g 5 min, les sembrem en una placa i deixem adherint durant 2 h. La selecció dels macròfags intersticials es fa rentant les cèl·lules en suspensió i seleccionant les cèl·lules adherides a la placa, obtenint una puresa del 80 %. Per avaluar les cèl·lules per camp i la puresa, fem citospins que tenyim amb tinció *Diff-Quick* (Diagnostics Grifols SA, Barcelona, Spain) segons el protocol del fabricant. Les cèl·lules contaminants són majoritàriament pneumòcits tipus II i cèl·lules ciliades.

3.2.- Anàlisi de marcadors d'activació dels macròfags.

En general, els macròfags es caracteritzen per una marcada heterogeneïtat determinada per l'estimulació microambiental a la que es veuen sotmesos. En funció del tipus d'estímul que rebim, poden seguir diferents vies d'activació que resultaran en un perfil o un altre de la resposta. En aquest treball hem utilitzat com a marcadors per les vies d'activació els següent gens:

- Macròfags clàssics o M1: TNF α i IL1 β
- Macròfags alternatius M2a: receptor de la manosa i arginasa I
- Macròfags alternatius M2c: IL10 i CD163

Hem avaluat la seva expressió per PCR a temps real semiquantitativa, comparant l'expressió dels gens d'interès amb la de la GAPDH (Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa) que ens servirà com a gen de referència.

PCR a temps real

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) és una tècnica utilitzada en biologia molecular per l'estudi de l'expressió de gens d'interès. Un cop extret l'RNA total, es passa a cDNA per l'acció d'una retrotranscriptasa, un enzim que sintetitza cDNA utilitzant l'RNA com a motlle. Finalment, mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa, s'amplifica el DNA utilitzant encebadors específics.

El protocol d'aquesta tècnica segueix els següents passos:

1. Extracció del RNA total:

L'extracció de l'RNA total es fa amb TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California), que és una solució que lisa les cèl·lules i dissol els seus components mantenint la integritat de l'RNA; seguint el procediment que indica el fabricant. Un cop lisat, s'afegeix cloroform i es centrifuga de manera que queden dues fases separades, una orgànica i una aquosa on es troba l'RNA. L'RNA és precipita amb isopropanol i es dissol amb aigua DEPC (*dietil pirocarbonada Nuclease-free water*) (Qiagen, Hilden, Germany). Finalment es valora la seva integritat i concentració per densitat òptica a 260 i 280 nm mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). L'RNA es congela a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

2. Pas de RNA a cDNA:

La conversió d'1 µg d'RNA a cDNA es du a terme amb el kit iScript cDNA de BioRad (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA). La reacció s'incuba a 25 °C durant 5 min, 42 °C durant 30 min i 85 °C durant 5 min per acabar a 4 °C amb l'aparell: DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA).

3. Quantificació de l'expressió dels gens d'interès per PCR a temps real:
 Per fer les PCR a temps real hem utilitzat SYBER Green com a fluorófor i es va dur a terme amb l'aparell *DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)*, utilitzant el Kit *IQTM SYBR Green mix (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)* i els encebadors corresponents. La seqüència dels encebadors està descrita en la Taula 2. L'amplificació es va realitzar amb una desnaturalització a 95 °C durant 1 min i 30 s seguida de 40 cicles a 95 °C durant 15 s, 60 °C durant 30 s i 72 °C durant 20 s i finalment, una incubació a 72 °C durant 2 min. Al final les mostres són sotmeses a una corba de temperatures per tal de confirmar l'especificitat dels productes de PCR descartant així amplifícacions inespecífiques o la formació de dímers d'encebadors. Cada mostra va ser normalitzada amb els nivell d'un gen control de l'expressió gènica endògena (GAPDH).

L'avaluació de les dades es va portar a terme amb el programa Opticon Monitor 3 d'acord amb les recomanacions del fabricant. Les reaccions es van portar a terme per triplicat. Els resultats es van analitzar segons el mètode del ΔC_t entre la GAPDH i el gen d'interès.

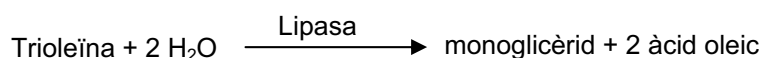
Taula 2 : Seqüència d'oligonucleòtids utilitzats en la PCR a temps real.

Nom	NM	Oligonucleòtid
GAPDH	NM_017008.3	F- ATG ACT CTA CCC ACG GCA AG R- GAT CTC GCT CCT GGA AGA TG
TNFα	NM_012675.3	F- AAC TCC CAG AAA AGC AAG CA R- CGA GCA GGA ATG AGA AGA GG
IL1β	NM_031512.2	F- AAA AAT GCC TCG TGC TGT CT R- TCG TTG CTT GTC TCT CCT TG
Rec manosa	NM_001106123.1	F- GCA GGT GGT TTA TGG GAT GT R- GGG TTC AGG AGT TGT TGT GG
Arginasa-I	NM_017134.2	F- GGG AAG ACA CCA GAG GAG GT R- TGA TGC CCC AGA TGA CTT TT
CD 163	NM_001107887.1	F- GGG GTT CCG TCT GTG ATT R- TCT GTC CGC TTC CTT CTC
IL 10	NM_012854.2	F- CAT CCG GGG TGA CAA TAA R- TGT CCA GCT GGT CCT TCT

3.3. – Determinació de dany pancreàtic i paràmetres inflamatoris.

3.3.1 Lipasa

La lipasa és un enzim digestiu secretat pel pàncrees que hidrolitza els triglicèrids en glicerol i àcids grassos. En el cas d'una pancreatitis aguda, aquest enzim es troba en elevades concentracions en plasma, el que permet utilitzar-lo com un marcador de dany pancreàtic. Per la seva determinació es va utilitzar un assaig de lipasa (Randox, Crumlin, Regne Unit) que mitjançant un mètode turbidimètric mesura la següent reacció:

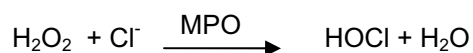


Amb un estàndard de l'enzim lipasa, la mostra (plasma) i el substrat de reacció, l'assaig mesura la disminució de la terbolesa en la mostra a una longitud d'ona de 340 nm.

3.3.2 Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa és un enzim present en els grànuls dels neutròfils polimorfonuclears que es fa servir com a marcador de presència d'aquestes cèl·lules en un teixit inflamat. La seva funció és destruir els microorganismes fagocitats, o bé, alliberat a l'exterior, crear un ambient tòxic a la zona afectada. El neutròfil genera grans quantitats de radical superòxid que es converteix ràpidament en peròxid d'hidrogen per la superòxid dismutasa (SOD). Aleshores, aquest peròxid d'hidrogen s'aprofita per reaccionar amb clorur i formar àcid hipoclorós, potent oxidant amb gran capacitat citotòxica.

La reacció catalitzada per la MPO *in vivo* és la següent:



El mètode es basa en la reacció de la tetrametilbenzidina (TMB) catalitzada per la MPO (Trush MA i cols 1994).

La TMB és un anàleg no cancerigen de la o-dianisidina que es feia servir originalment. Amb un tampó de reacció contenint peròxid d'hidrogen i TMB, la MPO present a la mostra catalitza la reacció de reducció de la TMB donant un

producte de color blau. La mesura de l'increment de color es realitza espectrofotomètricament a 620 nm de longitud d'ona.

3.3.3 Generació de nitrits

L'NO és generat per cèl·lules endotelials i cèl·lules inflamatòries en resposta a estímuls. Té una vida mitja molt breu $t_{1/2} = 4$ s. A nivells basals actua sobretot activant la guanilat ciclasa i incrementant els nivells de GMPc. En processos inflamatoris se'n generen grans quantitats i forma peroxinitrit, nitració de les tirosines, de grups tiols, etc.

En solucions aquoses l'NO s'oxida ràpidament a nitrit (NO_2^-). A més, en sang el nitrit passa a nitrat. La determinació fent servir el reactiu de Griess és prou sensible, però sols mesura el nitrit. Per cultiu de cèl·lules ja n'hi ha prou, però si la mostra és de sang o teixit cal fer un pas previ de reducció del nitrit a nitrat (Moshage H i cols 1995).

L'assaig es fa directament, tant sols cal tenir precaució amb medis amb color rosa. Els reactius G1(sulfanilamida + fosfòric) i G2 (NEDA + fosfòric) el tornen transparent, però pot ser bona idea fer la corba amb medi de cultiu. Alguns medis tenen molt nitrit, especialment si tenen FCS. Dispensem en una placa la corba i les mostres amb els reactius G1 i G2 i llegim en un espectrofotòmetre a 540 nm

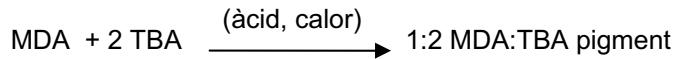
3.3.4 Lipoperòxids

El malondialdèhid (MDA) és un dels productes finals de baix pes molecular que es formen durant la descomposició d'alguns productes derivats de la peroxidació lipídica. Com que la peroxidació dels àcids grassos poliinsaturats té un paper molt important en la toxicitat del oxigen en sistemes biològics, la determinació dels nivells de MDA pot ser indicatiu del grau de lesió oxidativa de les membranes cel·lulars. De totes maneres, altres mecanismes també generen MDA de manera fisiològica (p.ex. la síntesi de Prostaglandines).

El sistema per mesurar l'MDA es basa en el fet que a baix pH i alta temperatura l'MDA reacciona amb l'àcid 2-tiobarbitúric (TBA) generant un adducte vermell (1:2 MDA:TBA). Un inconvenient que cal tenir en compte és que el TBA

reacciona amb altres substàncies a més de l'MDA. Per això, sovint es parla de TBARS (*TioBarbituric Acid Reacting Substances*) quan es fa servir aquesta tècnica. (Janero DR 1990)

La reacció que es fa servir és:



3.4 Preparacions histològiques

Per a les histologies, les mostres de teixit s'han fixat amb paraformaldehid 4%, s'han inclòs en blocs de parafina i tallat amb un gruix de 5 µm. Les seccions de teixit s'han tenyit amb el procediment estàndard per a Hematoxilina-Eosina.

3.5 Inmunohistoquímica

Els pulmons de rata van ser fixats amb paraformaldehid al 4%, es van incloure en blocs de parafina i es van tallar amb un gruix de 5 µm.

Les seccions de teixit van ser desparafinades i rehidratades. Tot seguit, van ser tractades amb citrat sòdic durant 30 min a 90 °C. Després es va bloquejar l'activitat peroxidasa endògena amb H₂O₂ (peròxid d'hidrogen) al 5 % i metanol. Es bloquegen les unions inespecífiques amb una solució de PBS, 3 % de *fetal calf serum* i 1 % BSA durant 2 hores a temperatura ambient. En aquest punt ja es poden incubar les seccions amb els anticossos primaris (Acris antibodies, herford, Germany) dirigits contra ED1 (Mouse anti-rat CD68) per als macròfags alveolars o ED2 (mouse anti-rat CD163) per als macròfags intersticials, a una dilució de 1:200 de cadascun dels anticossos, durant tota la nit a 4 °C. Després de rentar les mostres amb PBS-T (PBS amb Tritó al 0.2 %) van ser incubades durant 1 h amb l'anticòs secundari biotinitat (Acris antibodies, herford, Germany) a una dilució de 1:200. El sistema de revelat es basa en l'activitat peroxidasa sobre el seu substrat (H₂O₂) i amb una reacció acoblada que a partir de la diaminobenzidina (DAB) dona lloc a un precipitat de color marró. Per a això, després incubem les mostres 1 h amb Streptavidina-HRP (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA) diluïda 1:200 en una solució de bloqueig. Rentem i incubem amb DAB 30 min a temperatura ambient. Finalment les

seccions de teixit van ser contratenyides amb Hematoxilina de Harris. El colorant d'aquest tipus de tinció s'uneix a grups àcids tenyint així grups fosfats de DNA i proteïnes nuclears amb càrrega negativa. Les mostres van ser analitzades al microscopi òptic. El nombre de macròfags va ser avaluat amb un recompte de cèl·lules en 15 camps per a les dues diferents tincions.

3.6 Western Blot

El *Western-blot* és una tècnica que permet determinar la quantitat d'una proteïna en concret present en una mostra. Les metodologies que s'utilitzen per la realització d'un *Western-blot* són: en primer lloc, l'obtenció de l'extracte proteic i la determinació de la concentració de proteïna. I seguidament la detecció de proteïnes del lisat per mitjà de l'electroforesi, l'electrotransferència a una membrana de nitrocel·lulosa i la detecció de la proteïna desitjada per immunoquimioluminiscència.

Les cèl·lules es van lissar utilitzant el *Nuclear Extract Kit* (Active motive, Carlsbad, CA, USA). El sobrenedant amb l'extracte proteic es va recuperar, quantificar i congelar a -80 °C.

La valoració de proteïnes es va fer amb el mètode colorimètric de Bradford (BioRad, Richmond, CA, USA). Aquest assaig es basa en la reacció d'una solució àcida del colorant blau de Coomassie en resposta a diferents concentracions de proteïnes. El canvi de color que experimenta el blau de Coomassie al unir-se a proteïnes es pot mesurar en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm. Per tal de portar a terme aquesta valoració és necessari la preparació d'una corba estàndard que es va realitzar amb una solució d'Albúmina Sèrica Bovina (BSA) a diferents concentracions.

Les solucions utilitzades van ser les següents:

- Tampó de càrrega (4X)

950 µl XT Sample Buffer 4X (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)

50 µl β-mercaptoetanol

- Gel d'empaquetament

1.5 M Tris HCl (pH 8.8)

30 % Acrilamida

10 % SDS

10 % APS

TEMED

- Gel separador

1 M Tris HCl (pH 6.8)

30 % Acrilamida

10 % SDS

10 % APS

TEMED

- Tampó d'electroforesi (10X)

10 X Tris Glycine SDS (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)

Les mostres es van preparar afegint tampó de càrrega i escalfant 5 minuts a 100 °C per desnaturalitzar les proteïnes. El sistema d'electroforesi utilitzat va ser el Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Les mostres es van carregar al gel d'acrilamida i es va fer córrer a voltatge constant (100 V) fins que el blau de bromofenol de les mostres va començar a escapar-se per la part de baix del gel. A cada pouet del gel es va carregar una quantitat de proteïna que oscil·la entre els 40 i els 60 µg.

Per tal de poder treballar amb les proteïnes que s'han separat a l'electroforesi és útil transferir-les a un suport inert que les retingui. Amb aquesta intenció es fa la transferència de les proteïnes des de la matriu d'acrilamida a una membrana adequada. Hi ha diverses membranes que retenen les proteïnes de forma efectiva, en el nostre cas es van utilitzar membranes de nitrocel·lulosa Hybond ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Es tracta de posar el gel que ha migrat en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa i crear un camp magnètic que empenyi a les proteïnes a sortir del gel. D'aquesta manera

les proteïnes es queden sobre la membrana i seran susceptibles a unir-se als anticossos específics.

La transferència es va realitzar en el sistema *semi-Phor semi-dry transfer unit* (Hoefer Inc, Holliston, MA, USA) durant 1h 30 min a 140 mA, en el cas de transferir els gels de 2 en 2. L'amperatge s'ha adaptat a la quantitat de gels que es transfereixen. El tampó de transferència emprat va ser el següent:

- Tampó de transferència

10 % 10X Tris Gycine (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA)

20 % MeOH

A continuació per tal d'assegurar que la transferència s'havia dut a terme de forma efectiva, i les proteïnes s'havien transferit a la membrana, es van localitzar les diferents bandes proteiques mitjançant la tinció de les membranes amb una solució de Ponceau S (0,1 % Ponceau S i 5 % d'àcid acètic en aigua destil·lada).

Un cop les proteïnes han estat transferides a la membrana ja estan disponibles per la detecció per anticossos. Per eliminar els llocs d'unió inespecífics, la membrana s'ha de bloquejar amb proteïnes no reactives. En el nostre cas es va fer servir una dissolució de llet descremada en pols que s'uneix als llocs d'unió inespecífics que queden a la membrana després de la transferència. Després de bloquejar-les, les membranes s'incuben amb l'anticòs primari (específic per la proteïna d'interès). En el següent pas, un anticòs secundari conjugat a l'enzim peroxidasa reconeix l'anticòs primari que s'ha unit a la proteïna d'interès. L'últim pas és la detecció de la proteïna per luminescència a través d'una reacció enzimàtica que té lloc quan afegim peròxid d'hidrogen.

El bloqueig de les membranes es va fer amb una solució al 5 % en llet descremada en pols en TBST-1X durant una hora a temperatura ambient:

- TBS 20X:
500 mM Tris (pH 7.4)
60 mM KCl
2.8 M NaCl

- TBS 1X-T (TBS + 0.05 % Tween20)
5 % llet descremada en pols

Per la incubació de l'anticòs primari (Anti-IkB; Santa Cruz, CA, USA) es dilueix 1:1000 amb la mateixa solució de bloqueig .

Un cop ha transcorregut el temps d'incubació amb l'anticòs primari, es retira la membrana i es renta amb TBST-1X a temperatura ambient. Tot seguit s'incuba amb l'anticòs secundari a temperatura ambient durant 45-60 min. En el nostre treball l'anticòs secundari va ser *Anti-mouse IgG HRP*, BioRad 170-6516, Cabra a una dilució 1:3000

L'últim pas és la detecció de l'anticòs secundari gràcies a l'activitat peroxidasa. Els reactius de detecció que es van utilitzar són *l'Immun-Star HRP Peroxid Buffer* i *l'Immun-Star HRP Luminol/Enhancer* (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, USA) en proporció 1:1. Es van incubar les membranes amb al reactiu de luminescència durant 2 min en una cambra fosca de revelat, es va col·locar un film *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) sobre la membrana i es va deixar exposar el temps necessari. Tot seguit es van revelar els films en l'aparell *Optimax X-Ray Film Processor* (PROTEC, Germany). Un cop feta la detecció, la membrana es pot guardar a 4 °C ja que pot ser reutilitzada posteriorment per detectar altres proteïnes. Això es pot fer mitjançant el procés anomenat *stripping* que permet eliminar la presència d'anticossos de la membrana pràcticament sense alterar les proteïnes que s'hi han transferit. La membrana en qüestió és sotmet a un rentat de 5 min amb la solució d'*stripping* en agitació. Tot seguit, s'augmenta ràpidament el pH a 7-8 i es renta 3 vegades amb el tampó de rentat TBST-1X. A partir d'aquí es segueix amb el protocol descrit anteriorment.

- Solució d'*stripping*

0,2 M glicina

0,5 M NaCl (pH 2.8)

La quantificació de l'expressió de les proteïnes fa ser determinada mitjançant el programa *Image J* (National Institute of health, Bethesda).

3.7 DNA-binding

La unió de PPAR γ al PPRE (*Peroxisome proliferator response element*), per la seqüència consens 5'-AACTAGGTCAAAGGTCA-3', va ser mesurada mitjançant el kit basat en un ELISA, TransAm PPAR γ (Active motive, Carlsbad, CA, USA). La forma activada de PPAR γ a l'extracte nuclear va ser determinada usant anticossos específics per l'epítot que és accessible sols quan està activat i unit a la seva diana en el DNA. L'especificitat va ser comprovada mesurant la seva capacitat per inhibir la unió a oligonucleòtids *wild-type* solubles.

4 Anàlisi estadística

Les dades s'expressaran com promig \pm Error estàndard. Els promitjos s'han comparat mitjançant l'anàlisi unilateral de variança (ANOVA) i la significació estadística entre els diferents grups s'ha avaluat utilitzant el test de la t de Tukey determinant-se el nivell de significació estadística com una $p < 0.05$. Per fer l'anàlisi estadística vam utilitzar el programa *GraphPad* (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

RESULTATS I ARTICLES

Estudi 1:

In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. Gea-Sorlí S. and Closa D. *BMC Immunology*. 10:42 (2009)

La síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica és un dels processos fisiopatològics característics de la PA severa i el grau d'activació dels macròfags podria ser un dels factors que al final determinen la severitat d'aquesta malaltia. En aquest treball hem avaluat el fenotip d'activació dels macròfags peritoneals, durant la progressió d'un model experimental de pancreatitis aguda en rates. També, hem analisat l'efecte de la IL4 i IL13 per mirar de modular aquesta activació.

Els macròfags peritoneals mostren una activació clàssica o M1 a les 3 hores d'haver induït la pancreatitis que es manté 18 h més tard. *In vitro*, el tractament amb IL4 i IL13 reverteix l'activació dels macròfags del fenotip clàssic o M1 al Alternatiu o M2, però *in vivo*, falla modulant la resposta dels macròfags peritoneals. Finalment podem veure que la IL4 té una vida mitja més curta en el líquid ascític que en plasma. Aquest resultat suggereix que els enzims hidrolítics presents en el líquid ascític podrien estar involucrats en la degradació de citocines, impeding la modulació dels macròfags en la pancreatitis a través d'estratègies basades en l'administració de citocines

Research article

Open Access

***In vitro*, but not *in vivo*, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis**

Sabrina Gea-Sorlí and Daniel Closa*

Address: Dept. Experimental Pathology, IIBB-CSIC-IDIBAPS-CIBEREHD, Barcelona, Spain

Email: Sabrina Gea-Sorlí - sgsbam@iibb.csic.es; Daniel Closa* - dcabam@iibb.csic.es

* Corresponding author

Published: 31 July 2009

Received: 18 May 2009

BMC Immunology 2009, **10**:42 doi:10.1186/1471-2172-10-42

Accepted: 31 July 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/10/42>

© 2009 Gea-Sorlí and Closa; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Systemic inflammatory response syndrome is one of the major pathobiologic processes underlying severe acute pancreatitis and the degree of macrophage activation could be one of the factors that finally determine the severity of the disease. We evaluated the activation phenotype in peritoneal macrophages during the progression of an experimental model of acute pancreatitis induced in rats by intraductal administration of 5% sodium taurocholate and the effect of IL-4 and IL-13 to modulate this activation.

Samples of pancreas, lung and adipose tissue as well as plasma were also obtained. In some animals IL4 and IL13 were injected 1 h after induction in order to modulate macrophage activation. The expressions of TNF α and Mannose Receptor, as indicators of classical and alternative macrophage activation, were evaluated. Levels of myeloperoxidase and plasma lipase were determined to evaluate the severity of the inflammatory process. The stability of IL-4 in ascitic fluid and plasma was evaluated.

Results: Peritoneal macrophages showed a classical M1 activation clearly induced 3 h after pancreatitis induction and maintained until 18 h. Treatment with IL-4 and IL-13 reversed the activation of macrophages from a classical M1 to alternative M2 *in vitro*, but failed to modulate the response of peritoneal macrophages *in vivo* despite a reduction in inflammation was observed in lung and adipose tissue. Finally, IL-4 shows a short half-live in ascitic fluid when compared with plasma.

Conclusion: Peritoneal macrophages adopt a pro-inflammatory activation early during acute pancreatitis. Treatment with M2 cytokines could revert *in vitro* the pancreatitis-induced activation of macrophages but fails to modulate its activation *in vivo*. This treatment has only a moderate effect in reducing the systemic inflammation associated to acute pancreatitis. Hydrolytic enzymes presents in ascitic fluid could be involved in the degradation of cytokines, strongly reducing its utility to modulate peritoneal macrophages in pancreatitis.

Background

Acute pancreatitis is an inflammatory process of the pancreatic gland that in the severe forms involves remote

organ systems. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is one of the major pathobiologic processes underlying severe acute pancreatitis. This is of major

importance because half of deaths in the first weeks of the process are attributed to organ failure, and in particular the acute respiratory distress syndrome, associated with SIRS [1]. Despite advances in diagnosis and treatment of inflammatory pancreatic disease, to date, supportive care remains the only treatment for patients with pulmonary complications [2].

Several proinflammatory mediators have been identified to play a role in the progression of the local pancreatic damage to the systemic inflammation. This includes tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, MCP-1 or Platelet activating factor [3]. Some of these mediators are released by pancreatic acinar cells and results in the recruitment of neutrophils and monocytes. In addition, other inflammatory cell populations contribute to the systemic generation of inflammatory mediators. In particular, it has been reported that peritoneal macrophages, alveolar macrophages and Kupffer cells become activated in the early stages of severe acute pancreatitis [4-6]. Since macrophages orchestrate both the initiation and the resolution of inflammation, it is suspected that the degree of macrophage activation could be one of the factors that finally determine the severity of the process.

However, macrophages could be activated in different pathways. The initial inflammatory response is mediated by classically activated macrophages (M1) while the resolution phase is carried out by alternatively activated (M2) macrophages [7]. M1 macrophages are induced by IFN γ or LPS and synthesize and release constitutive amounts of inflammatory mediators such as TNF α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide. The biological activities of M1 macrophages are characterized by its antimicrobial and cytotoxic properties, related with their role in host responses to infection or autoimmune diseases. By contrast, M2 macrophages, that are induced by IL-4 or IL-13, do not generate these mediators but promote proliferative and angiogenic processes [8]. These M2 macrophages play a role in modulating wound healing, suppressing the inflammatory response and synthesising extracellular matrix.

The characteristics of acute pancreatitis suggest that activation of macrophages correspond to the classical M1 phenotype. However, there are no data about the phenotypic status of different macrophage populations during the progression of acute pancreatitis and the relation between the differentiation to M1 phenotype and the severity of the disease.

In this work we have used an experimental model of acute pancreatitis induced by intraductal administration of sodium taurocholate to evaluate how the progression of pancreatitis correlates with the M1 activation of peritoneal macrophages as well as the effect of IL-4 and IL-13, administered after the induction of pancreatitis, in pre-

venting the M1 activation and inducing the reparative M2 phenotype. We demonstrated that pancreatitis results in an M1 activation of peritoneal macrophages that could be reverted in vitro by treatment with IL-4 and IL-13. However, in vivo administration of these cytokines after induction of pancreatitis does not modulate the activation of peritoneal macrophages. The effect of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF) on the cytokines could explain this lack of effects.

Methods

Animals

Male Wistar rats (250–300 g b.w.) were used in all experiments (Charles River, France). Animals were housed in a controlled environment and fed with standard laboratory pelleted formula (A04, Panlab, Barcelona, Spain) and tap water *ad libitum*. This study conformed to European Community for the use of experimental animals and the institutional committee of animal care and research approved it.

Animal model of acute pancreatitis

Animals (n = 6 each group) were anesthetized with an i.p. administration of sodium pentobarbital (50 mg/kg). The biliopancreatic duct was cannulated through the duodenum and the hepatic duct was closed by a small bulldog clamp. Pancreatitis was induced by retrograde perfusion into the biliopancreatic duct of 5% sodium taurocholate (Sigma, St Louis, Missouri, USA) in a volume of 0.1 ml/100 g b.w. using a perfusion pump (Harvard Instruments, Edenbridge, UK) [9]. The same procedure was applied to control animals but receiving an intraductal perfusion of saline solution (NaCl 0.9%) instead of taurocholate. Three or eighteen hours after induction, peritoneal macrophages were obtained. Five ml of blood were obtained from the cava vein, heparinized and centrifuged to obtain plasma. Ascitic fluid, and samples of pancreas, white adipose tissue (WAT) and lung were also obtained, immediately frozen and stored at -80°C until used.

In a second experiment, IL-4 (4 μ g/kg) and IL-13 (4 μ g/kg) were i.p. administered to an additional group 1 h after the induction of pancreatitis. In these animals, macrophages, plasma and tissue samples were obtained three hours after the induction of pancreatitis.

Isolation and culture of macrophages

Peritoneal macrophages were harvested by 5 peritoneal washes with 10 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 3 units/ml heparin. The obtained cell suspension was centrifuged (300 \times g; 7 min). Cells were suspended in the RPMI1640 culture medium containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μ g/ml). Aliquots of about 3 \times 10⁶ cells were plated in 6 wells plates and cultured at 37°C under a gas phase of air/CO₂ (95:5). After an attachment

period of 4 h, the non-adherent cells were removed by shaking. The resulting adherent population consisted of > 92% macrophages as judged by CD68 staining measured by flow cytometry.

In vitro reversion of phenotypic changes in macrophages

Peritoneal macrophages obtained from control animals as well as animals 18 hours after pancreatitis induction were incubated for 24 h with IL-4/IL-13 (10 ng/ml each) in order to evaluate their capacity to reverse the acquired M1 phenotype. This mixture of cytokines has been reported to be more effective than IL-4 or IL-13 alone on inducing an M2 phenotype in macrophages [10]. After the incubation period RNA was obtained and the expression of TNF α and Mannose Receptor were evaluated by quantitative RT-PCR.

Degradation of IL-4 in ascitic fluid and plasma

To evaluate the effect of hydrolytic enzymes presents in ascitic fluid or plasma during pancreatitis on the stability of interleukins, the half life of IL-4 on these biological fluids has been determined. Plasma or ascitic fluid obtained from animals with pancreatitis were pooled and overloaded with IL-4 (25 pg/ml). Samples were incubated at 37°C for 2 h, 1 h, 30 min and 15 min after the addition of IL-4 and the concentration of IL-4 was measured by ELISA. The experiment has been carried out by triplicate.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA from cells was extracted using the TRizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The RNA was quantified by measurement of the absorbance at 260 and 280 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA).

cDNA was synthesized using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and reverse transcription was then performed on 1 μ g RNA sample by adding iScript reagents. The reaction was incubated at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, and 85°C for 5 min, and then stored at -80°C.

Subsequent PCR amplification was performed in a DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) using IQTM SYBR Green Super mix and the correspondent rat primers: TNF α forward: 5'-AACTCCCA-GAAAAGCAAGCA-3' reverse: 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'; Mannose Receptor forward: 5'-GCAGGTGGTTTATGGGATGT-3' Reverse: 5'-GGGTTTCAGGAGTTGTTGTGG-3'; GAPDH forward: 5'-CTGTGTCTTTCCGCTGTTTC-3' and reverse: 5'-TGTGCT-GTGCTTATGGTCTCA-3'.

Initial denaturation was followed by 40 cycles of DNA amplification with fluorescence detection at the end of the

elongation step (SYBR Green format). Reactions were performed in duplicate and threshold cycle values were normalized to GAPDH gene expression. The specificity of the products was determined by melting curve analysis. The ratio of the relative expression of target genes to GAPDH was calculated by using the $\Delta C(t)$ formula.

Lipase

Plasma lipase was determined by using commercial turbidimetric assay kits from Randox (Antrim, U.K.), according to the supplier's specifications.

Myeloperoxidase

Neutrophilic infiltration was assessed by measuring myeloperoxidase (MPO) activity. MPO was measured photometrically with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate. Tissue samples were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM phosphate buffer at pH 6.0. Homogenates were disrupted for 30 seconds using a Labsonic sonicator (Braun Biotech, Inc., Allentown, PA) at 20% power and submitted to three cycles of snap freezing in dry ice and thawing before a final 30 second sonication. Samples were incubated at 60°C for 2 hours and then spun down at 4000 g for 12 minutes. The supernatants were collected for MPO assay. Enzyme activity was assessed photometrically at 630 nm. The assay mixture consisted of 20 μ l supernatant, 10 μ l tetramethylbenzidine (final concentration 1.6 mM) dissolved in DMSO, and 70 μ l H₂O₂ (final concentration 3.0 mM) diluted in 80 mM phosphate buffer, pH 5.4. The results are expressed as units (U) MPO activity per g protein.

Statistical analysis

Data have been expressed as mean \pm SEM. Means of different groups were compared using a one-way analysis of variance. Tukey's multiple comparison test was performed for evaluation of significant differences between groups. Differences were assumed to be significant when $p < 0.05$.

Results

Pancreatitis induction

Acute pancreatitis results in a significant increase in lipase levels in plasma at 3 and 18 hours after induction. The inflammatory process, evaluated as MPO activity indicates a strong leukocyte infiltration in pancreas, WAT and lung at both time periods (figure 1).

Macrophage activation

Analysis of peritoneal macrophage activation indicates that 3 hours after induction it is induced a strong expression of TNF α . At this time point there was no significant changes in Mannose Receptor expression, indicating the activation following the expected M1 phenotype. Interestingly, 18 hours after induction, the expression of TNF α

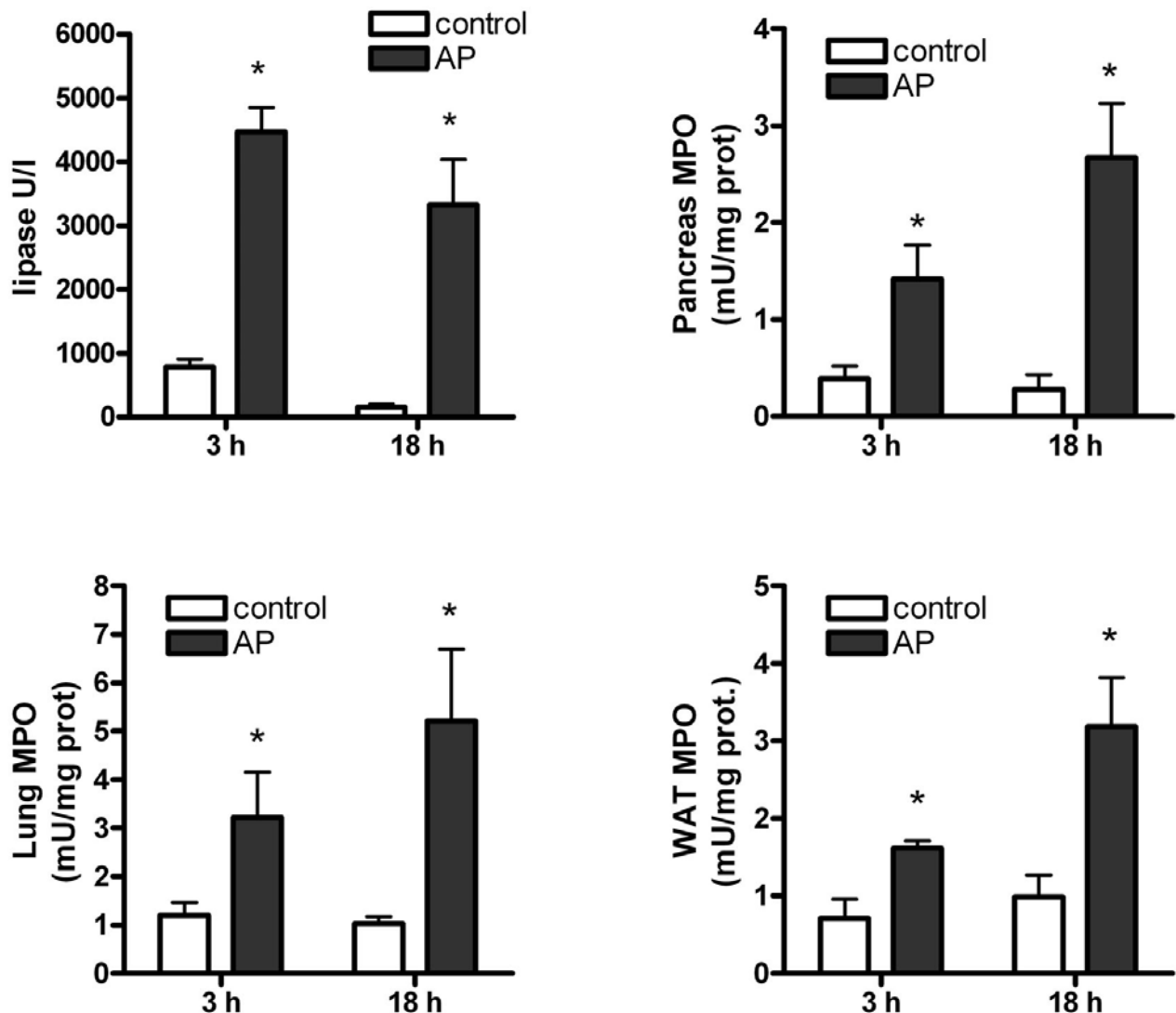


Figure 1
Lipase and MPO activity in pancreas, lung and white adipose tissue (WAT) 3 and 8 hours after induction of pancreatitis. * = $p < 0.05$ vs. control.

remains induced but in a less intense level while Mannose Receptor remained unchanged (figure 2).

In vitro reversibility of the phenotype

Peritoneal M1 activated macrophages are important sources of pro-inflammatory cytokines that could contribute to the induction and maintaining of the systemic inflammatory status. Consequently in order to design therapies focussed on modulating macrophages activity it is of interest to evaluate the capacity of these cells to change their phenotype. With this purpose we treated *in vitro* peritoneal macrophages obtained 18 hours after inducing pancreatitis, with IL-4 plus IL-13, which are

known to induce a M2 phenotype in macrophages [11]. Results indicate that incubation with these cytokines *in vitro* results in the reversion of the M1 phenotype and in an increased expression of Mannose Receptor, an M2 related gene (figure 3).

In vivo treatment with M2 cytokines

The reversion of M1 phenotype of activated macrophages during the acute phase of pancreatitis could be an interesting therapeutical approach. With this purpose an additional group of animals was treated with IL-4 and IL-13 one hour after the induction of the disease. Two hours later (this is three hours after the induction of pancreati-

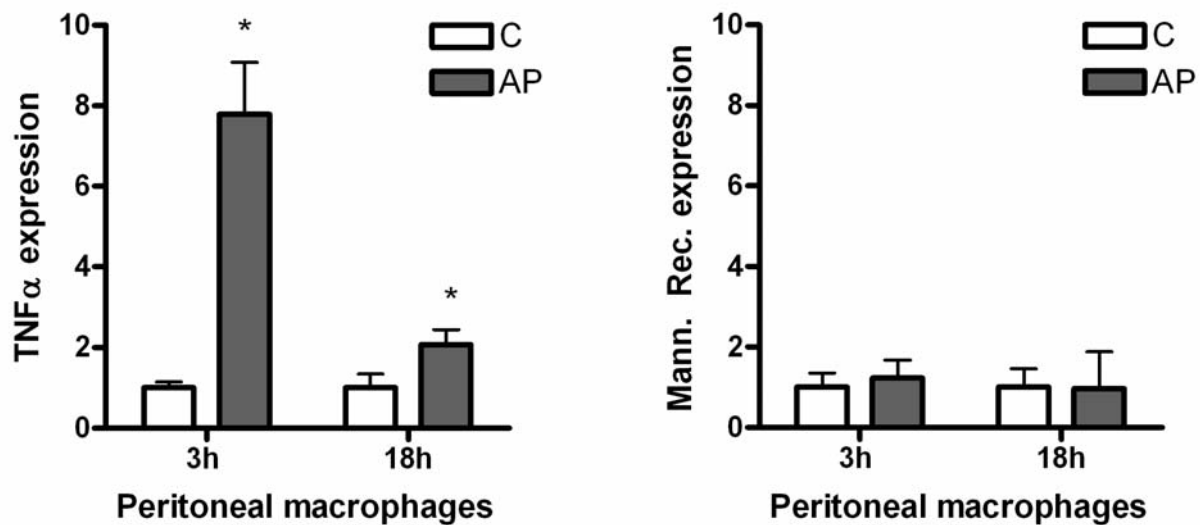


Figure 2
Changes in the mRNA expression of TNF α and mannose receptor in peritoneal macrophages evaluated by RT-PCR. Results are expressed as increases with respect to the control group. * = $p < 0.05$ vs. control.

tis), we evaluated the progression of the inflammatory process as well as the changes in the phenotype acquired by the peritoneal macrophages.

Administration of M2 cytoquines has no effect on the M1 activation of peritoneal macrophages (figure 4). However, it results in a decrease in the inflammatory response observed in the lung and WAT (figure 5). As expected, cytokine treatment does not modify the pancreatic damage or inflammation and lipase as well as MPO in pancreas remained unchanged (figure 5).

When measuring the concentrations achieved of IL-4 in plasma no measurable levels were found even after the intraperitoneal administration of interleukins.

Degradation of IL-4 in ascitic fluid

Measures of PAAF overloaded with IL-4 revealed a fast degradation of the cytokine in this biological fluid. A half life of 16.4 min was obtained, contrasting with the higher stability observed in plasma, with a half life of 51.1 min (Figure 6).

Discussion

Systemic inflammation is a major complication of severe acute pancreatitis being the associated acute lung injury and renal failure characteristics of the end stages of the process. Measurements of cytokines in plasma of patients or in experimental models revealed increases in inflammatory mediators, including TNF α , IL-1, IL-6, MIP2, or

MCP in a situation defined as "cytokine storm" that results in an uncontrolled inflammatory process in several organs [12].

In this context, macrophages play a pivotal role due to their ability to generate pro or anti-inflammatory mediators that control the progression of the inflammatory process. Different reports demonstrate the involvement of activated peritoneal, alveolar or hepatic macrophages in the pathogenesis of acute pancreatitis [5,6]. This central role in the regulation of inflammation made the macrophages interesting targets in order to design therapeutical strategies focussed in the control of the systemic effects of acute pancreatitis.

In this work we observed that peritoneal macrophages showed an early and intense M1 activation reflected in the high expression of TNF α , and the lack of changes in Mannose Receptor. This could be observed three hours after induction and remains in similar phenotypic profile at 18 h. The main difference between these two time periods is the reduction in the expression of TNF α . This fact agrees with the kinetics observed in several *in vitro* experiments when macrophages are stimulated with pro-inflammatory mediators. The initial peak of TNF α generation is followed by the expression of other cytokines, mainly IL-1 β and IL-8.

This activation was expected since peritoneal macrophages are in the peritoneal cavity, in direct and early con-

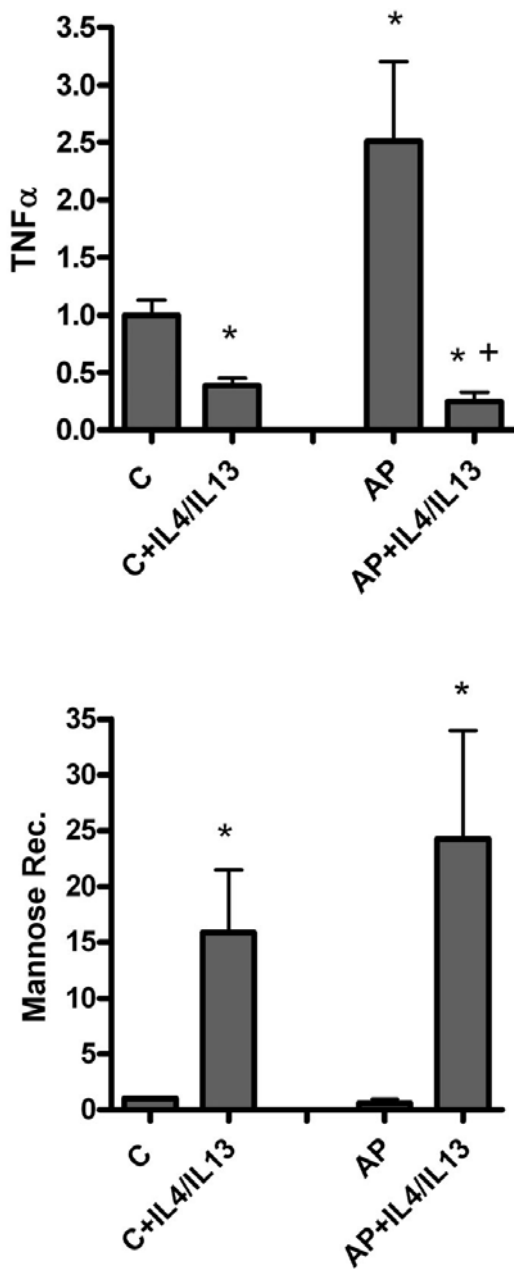


Figure 3
Reversibility of macrophage phenotype was observed on incubating peritoneal macrophages obtained 18 hours after pancreatitis induction and incubated with a mixture of IL-4 plus IL-13 for 24 hours. This treatment resulted in the inhibition of TNF α expression as well as the induction of Mannose receptor in both control and AP macrophages. Results are expressed as increases with respect to the control group. * = $p < 0.05$ vs. control; + = $p < 0.05$ vs AP.

tact with mediators released by pancreatic tissue. Ascitic fluid generated in the severe acute pancreatitis contains pancreatic enzymes and cytokines in a concentration that exceeds that observed in plasma in on order of magnitude [13]. The M1 phenotype induced by these mediators can increase the inflammatory response associated with acute pancreatitis through the release of other macrophage-derived inflammatory cytokines. However, several works reported on the plasticity of activation phenotype acquired by macrophages and their capability to be reprogrammed by the effect of M1 or M2 cytokines [11,14]. Consequently, it could be of interest to know the capacity of these pancreatitis-activated peritoneal macrophages to be reverted to an antiinflammatory and reparative M2 phenotype. We have evaluated this possibility *in vitro* by treating pancreatitis-activated peritoneal macrophages with a mixture of IL-4 and IL-13. These cytokines are known to induce the alternative M2 activation of macrophages, promoting the repair phenotype and counteracting the effects of pro-inflammatory cytokines [7].

Results indicate that activated peritoneal macrophages obtained during pancreatitis could be re-directed to M2 phenotype by the effect of IL-4 and IL-13 treatment (figure 3). This was evidenced by the reduction in TNF α expression that parallels with the induction of Mannose Receptor.

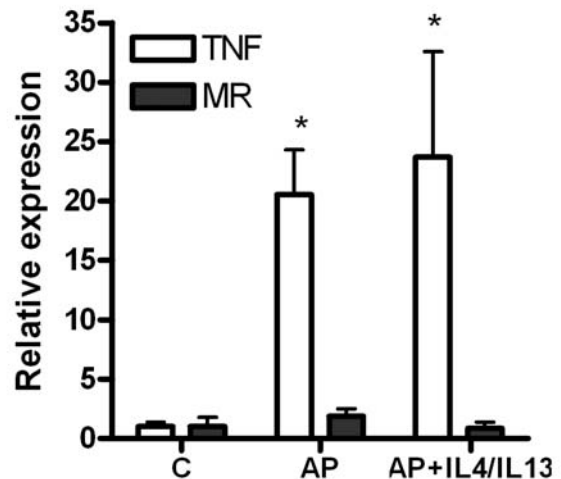


Figure 4
In vivo administration of IL-4 plus IL-13 does not accomplish to reduce the macrophages activation in the early stages of pancreatitis. No changes were observed in TNF α or Mannose receptor expression in peritoneal macrophages. Results are expressed as increases with respect to the control group. * = $p < 0.05$ vs. control.

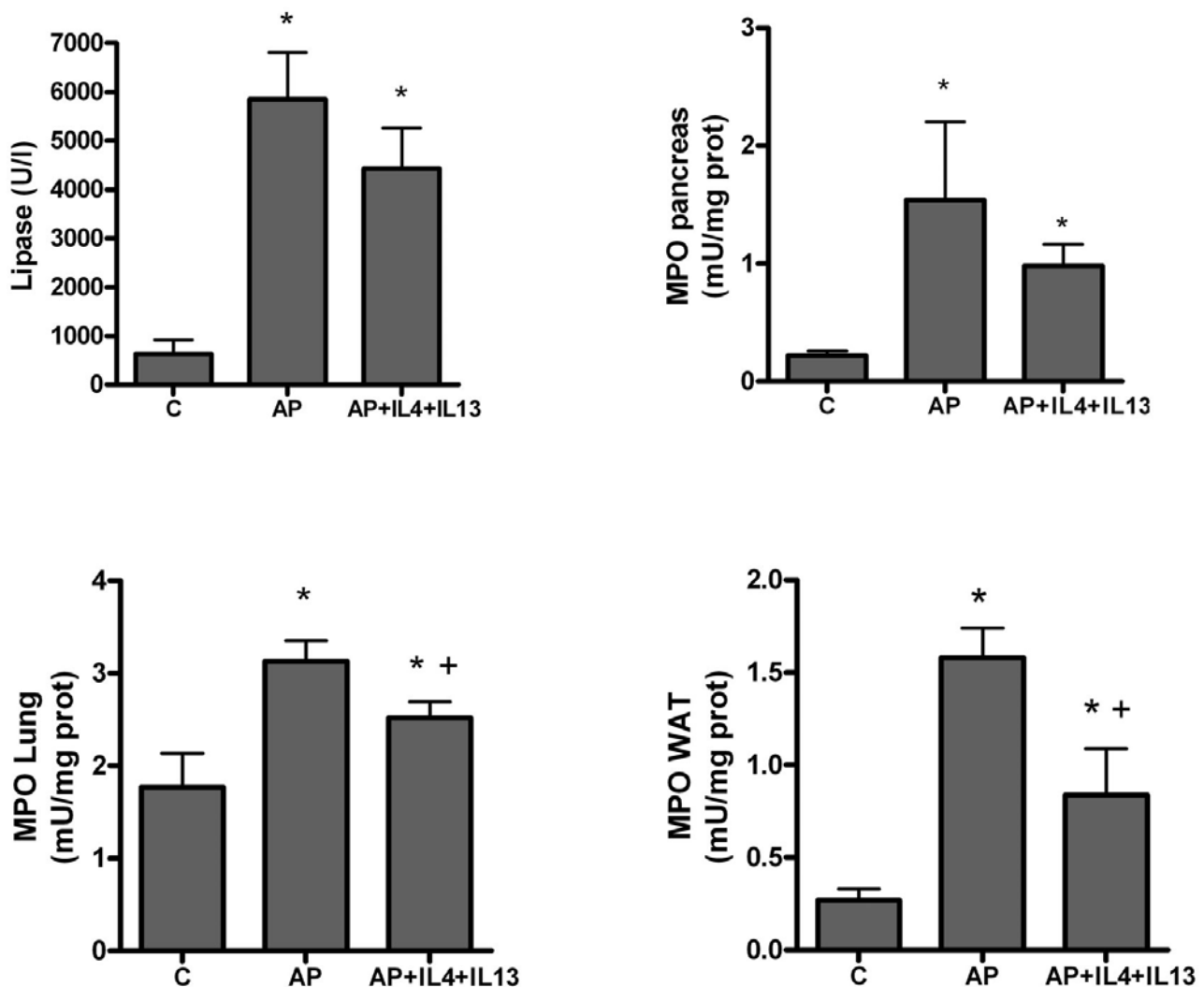


Figure 5

Effect of IL-4 and IL-13 administration on the progression of the early stages of inflammation. No changes were observed in lipase activity in plasma or in MPO levels in pancreas. By contrast, a significant inhibition of MPO in lung and white adipose tissue (WAT) indicates a reduction of the systemic inflammation. * = $p < 0.05$ vs. control; + = $p < 0.05$ vs. AP.

In a subsequent experiment we tried to modulate *in vivo* the activation of peritoneal macrophages. For this purpose, interleukins 4 and 13 were administered i.p. one hour after the induction of pancreatitis and two hours later we evaluated the progression of the inflammatory process as well as the activation of macrophages. This was a short time period to achieve a complete M2 phenotype, but the fast progression of the disease do not allows prolonged treatments. The objective was only to achieve a reduction in the intensity of the M1 activation that could result in a decrease in the systemic inflammation.

As expected, interleukins treatment 1 h after induction has no effect on the pancreatic tissue damage which, in this model of pancreatitis, is directly induced by the effect of

taurocholate on acinar cells. This was evident by the lack of changes in the increased plasma lipase activity. Pancreas inflammation also was unmodified according the MPO results. By contrast, a moderate but significant reduction in lung and WAT inflammation was observed (figure 5). However, these changes appear to be unrelated with the peritoneal macrophage activation because the M1 phenotype induced by pancreatitis remains similar to that observed in the non-treated group (figure 4).

It has been observed in several experimental models that IL-4 could modulate the regulation of complement activation [14] or the generation of IL-10 in chronic pancreatitis [15]. Some of these effects could explain the reduction in the inflammation observed in our experimental condi-

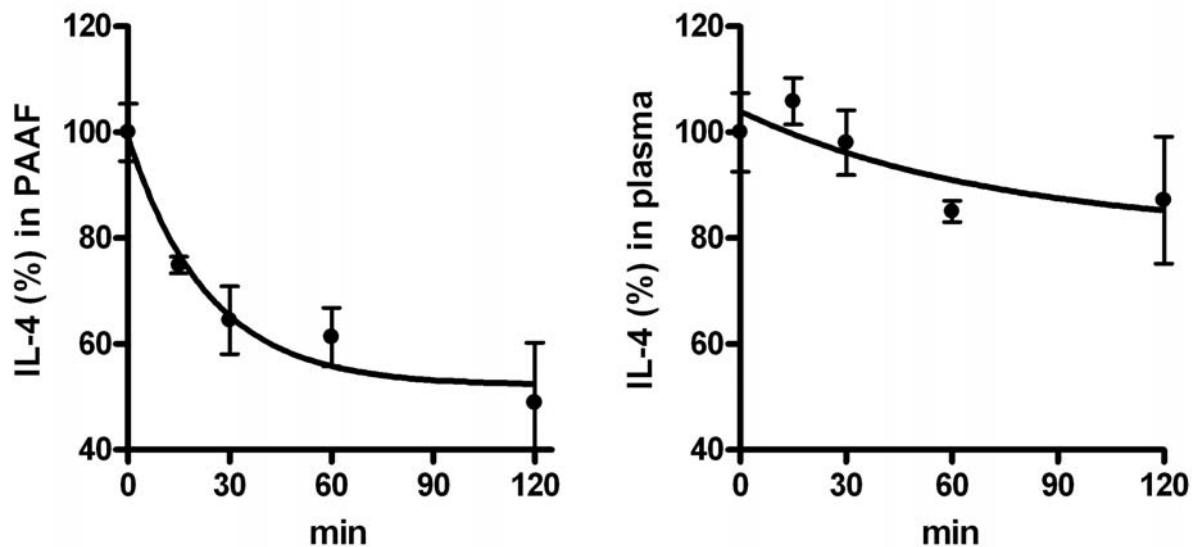


Figure 6

Degradation of IL-4 in pancreatitis-associated ascitic fluid (left) and in plasma (right). PAAF or plasma from pancreatitis were pooled and overloaded with 25 pg/ml IL-4 and the concentration was measured at different time-points. In ascitic fluid, degradation of IL-4 was observed, with a half-life of 16.4 min. By contrast, half life in plasma was 51.1 min. Values are the mean of three different experiments.

tions. However, it is clear that interleukin administration was not enough to therapeutically modulate the M1 phenotype observed in peritoneal macrophages. This lack of changes after M2 cytokines administration could be related with the strong proinflammatory environment generated in the peritoneal cavity, but also by the hydrolytic activity of ascitic fluid.

In this sense, when measuring the stability of IL-4 in ascitic fluid we observed a fast degradation of this cytokine. These changes were not observed in plasma and could be related with the hydrolytic enzymes released by pancreatic tissue to the ascitic fluid. This fact also explains the lack of measurable increases in IL-4 levels in plasma of treated animals. It must be pointed out that the intraperitoneal administration of cytokines was selected since our objective was to act on peritoneal macrophages. Consequently, the administration of cytokines to modulate the activation of macrophages during the progression of acute pancreatitis appears to be useful for act on several cell populations but not for the peritoneal macrophages.

Conclusion

Our results indicate that peritoneal macrophages adopt a pro-inflammatory activation early during acute pancreatitis and that they could be reprogrammed *in vitro* to a

reparative M2 phenotype by IL-4 and IL-13. However, *in vivo* this treatment has only a moderate effect in reducing the systemic inflammation and fails to prevent the peritoneal macrophage activation. This lack of effect seems to be related with the degradation of interleukins by the action of ascitic fluid present in the peritoneal cavity. Consequently, different therapeutic approaches will be needed to modulate the activation of this cell population for the treatment of severe acute pancreatitis.

Authors' contributions

SGS participated in animal surgery, carried out the *in vitro* studies and the analytical processes and helped to draft the manuscript. DC conceived of the study, and participated in its design and coordination and draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the projects SAF2006-08449 and CSIC 2006-2-01-013

References

1. Klöppel G, Maillet B: **Pathology of acute and chronic pancreatitis.** *Pancreas* 1993, **8**:659-670.
2. Buter A, Imrie CW, Carter CR, Evans S, McKay CJ: **Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis.** *Br J Surg* 2003, **89**:298-302.

3. Granger J, Remick D: **Acute pancreatitis: models, markers, and mediators.** *Shock* 2005, **24(Suppl 1)**:45-51.
4. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, et al.: **Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats?** *Pancreas* 2003, **27**:253-260.
5. Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Roselló-Catafau J: **Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver.** *Ann Surg* 1999, **229**:230-236.
6. Folch E, Prats N, Hotter G, López S, Gelpi E, Roselló-Catafau J, Closa D: **P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis.** *Dig Dis Sci* 2000, **45**:1535-1544.
7. Gordon S: **Alternative activation of macrophages.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:23-35.
8. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M: **Macrophage activation and polarization.** *Front Biosci* 2008, **13**:453-461.
9. Aho HJ, Suonpää K, Ahola RA, Nevalainen TJ: **Experimental pancreatitis in the rat.-Ductal factors in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis.** *Exp Path* 1984, **25**:73-79.
10. Hart PH, Bonder CS, Balogh J, Dickensheets HL, Donnelly RP, Finlay-Jones JJ: **Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13.** *J Leukoc Biol* 1999, **66**:575-8.
11. Wang Y, Wang YP, Zheng G, et al.: **Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease.** *Kidney Int* 2007, **72**:290-299.
12. Makhija R, Kingsnorth AN: **Cytokine storm in acute pancreatitis.** *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002, **9**:401-10.
13. Dugernier TL, Laterre PF, Wittebole X, Roeseler J, Latinne D, Reynaert MS, Pugin J: **Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**:148-157.
14. Zhang C, Ge CL, Guo RX, He SG: **Effect of IL-4 on altered expression of complement activation regulators in rat pancreatic cells during severe acute pancreatitis.** *World J Gastroenterol* 2005, **11**:6770-6774.
15. Brock P, Sparmann G, Ritter T, Jaster R, Liebe S, Emmrich J: **Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 into pancreatic stellate cells promotes interleukin-10 expression.** *J Cell Mol Med* 2006, **10**:884-895.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Estudi 2:

Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. Gea-Sorli S, Guillamat R, Serrano-Mollar A and Closa D. *The Journal of Pathology* 223:417-424 (2011)

En el tracte respiratori existeixen dues poblacions diferents de macròfags: els macròfags alveolars en els alvèols i els macròfags intersticials en d'interstici pulmonar.

Ja que la pancreatitis progressa en paral·lel amb el dany pulmonar associat a aquesta malaltia, el perfil d'activació d'aquestes subpoblacions de macròfags podria ser rellevant en seva progressió.

En aquest treball hem analitzat el fenotip que adopten els macròfags alveolars i intersticials en un model de pancreatitis en rates, per l'administració intraductal de taurocolat sòdic al 3.5 %. Hem observat que, els macròfags alveolars presenten un fenotip M1 al inici de la malaltia caracteritzat per l'expressió de citocines proinflamatories i l'activació de NF-κB. En canvi, els macròfags intersticials segueixen una polaritat M2b amb l'expressió de citocines antiinflamatories com la IL10 i el CD163, i l'activació de PPAR γ . Aquests resultats suggereixen que aquestes poblacions de macròfags juguen un paper diferent en la progressió de la pancreatitis. Els macròfags alveolars promouen una resposta inflamatory al inici de la malaltia mentre que les macròfags intersticials ajuden en la resolució de la inflamació.

Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis

Sabrina Gea-Sorlí,^{1,2} Raquel Guillamat,^{1,3} Anna Serrano-Mollar^{1,3} and Daniel Closa^{1,2*}

¹ Department of Experimental Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain

*Correspondence to: Daniel Closa, Department of Experimental Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC), c/Roselló 161, 7^o, Barcelona 08036, Spain. e-mail: dclbam@iibb.csic.es

Abstract

Pulmonary macrophages exist in two different anatomical compartments in the lower respiratory tract: alveolar macrophages in the alveoli and interstitial macrophages in the interstitium. Depending on the micro-environmental stimulation, macrophages follow different activation pathways. According to their inflammatory response pattern, activated macrophages have been characterized as pro-inflammatory (M1), wound-healing (M2a) and regulatory (M2b). Since acute pancreatitis occurs in parallel with acute lung injury, the profile of the different macrophage subpopulations could be relevant in the progression of the disease. The activation of lung alveolar and interstitial macrophages was assessed in an experimental model of severe acute pancreatitis induced in rats by intraductal infusion of 3.5% sodium taurocholate. Alveolar and interstitial macrophages were obtained and the expression of markers of different activations was evaluated. Activation of nuclear factors PPAR γ and NF- κ B, which are involved in the acquisition of different phenotypes, was also measured. Alveolar macrophages acquired an early M1 phenotype characterized by the expression of inflammatory cytokines and NF- κ B activation. In contrast, interstitial macrophages followed the inhibitory M2b pathway. In these macrophages, PPAR γ became activated and the anti-inflammatory cytokine IL-10 was expressed. These results suggest that alveolar and interstitial macrophages play different roles in acute lung injury associated with acute pancreatitis. Alveolar macrophages promote an early inflammatory response, whereas interstitial macrophages help resolve inflammation.

Copyright © 2010 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: inflammation; alveolar; macrophage; pancreatitis; ARDS

Received 13 September 2010; Revised 11 October 2010; Accepted 13 October 2010

No conflicts of interest were declared.

Introduction

In the early stages of acute pancreatitis, the first sign of multi-organ dysfunction is impaired lung function. This is important because lung failure is the principal cause of death during the first week in patients with severe acute pancreatitis [1]. Transition from local pancreatic damage to systemic inflammation determines the severity of disease progression. The lung injury is characterized by increased endothelial permeability, activation of the macrophages and infiltration of neutrophils into the interstitium. The mechanisms through which lung injury is induced in acute pancreatitis are not clear, but increasing evidence implicates pro-inflammatory cytokines and oxidative stress in the development of the systemic complications [2,3].

In addition to pancreatic acinar cells activated by the initial damage, macrophages play a central role in the systemic generation of inflammatory mediators during acute pancreatitis [4]. In experimental models of acute

pancreatitis, the activation of different populations of macrophages, including peritoneal macrophages [5], Kupffer cells [6] and alveolar macrophages, has been reported [7]. However, macrophages are highly versatile cells and local environment factors could shape their phenotypic and functional properties [8]. Thus, to understand the mechanisms involved in the progression of systemic inflammation and to design treatments to reduce the impact of the distant effects of acute pancreatitis, it is essential to take into account the phenotype acquired by each population of macrophages. This is of particular importance in the case of the lung, an organ with two different macrophage populations, alveolar and interstitial [9].

Activated macrophages can be classified into three groups [10]. The first group consists of classically activated (M1) macrophages, which act as immune effector cells secreting oxygen and nitrogen radicals, and inflammatory cytokines that regulate and amplify Th1 immune response and inflammation. A second group consists of the wound-healing (M2a) macrophages.

These cells produce minimal amounts of inflammatory mediators, but promote the production of extracellular matrix and tissue remodelling. Finally, the third group consists of the regulatory (M2b) macrophages, which arise in later stages and seem to inhibit the immune response and limit inflammation by generating anti-inflammatory mediators, such as IL-10.

Although this classification is useful, it only represents some points in the broad spectrum of phenotypes acquired by macrophages. This is because these cells show a high degree of flexibility in adapting their functions to their environment [8].

The current study evaluated the activation of alveolar macrophages and interstitial macrophages after induction of experimental acute pancreatitis. We observed that these two cell populations show different activation profiles and kinetics, which means that they make up two different therapeutic targets for the treatment of lung inflammation associated with acute pancreatitis.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats, body weight (b.w.) 250–300 g, were used in all experiments (Charles River, France). The animals were housed in a controlled environment and fed with a standard laboratory pelleted formula (A04, Panlab, Barcelona, Spain) and tap water *ad libitum*. This study conformed to European Community rules for the use of experimental animals and was approved by our animal care and research committee.

Animal model of acute pancreatitis

The animals ($n = 6$ in each group) were anaesthetized by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital (50 mg/kg). The biliopancreatic duct was cannulated through the duodenum and the hepatic duct was closed by a small bulldog clamp. Pancreatitis was induced by retrograde perfusion into the biliopancreatic duct of 3.5% sodium taurocholate (Sigma, St. Louis, MI, USA) in a volume of 0.1 ml/100 g b.w., using a perfusion pump (Harvard Instruments, Edenbridge, UK) [11]. The same procedure was applied to control animals, but these received an intraductal perfusion of saline solution (NaCl 0.9%) instead of taurocholate. At 3, 6 and 24 h after induction, alveolar and lung interstitial macrophages were obtained. In addition, 5 ml blood was taken from the vena cava and heparinized and centrifuged to obtain plasma in order to verify the severity of pancreatitis by measuring lipase activity.

Isolation and culture of macrophages

After exsanguination, the lung and trachea were excised *en bloc*, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and lavaged 10 times with 10 ml cold (4 °C) saline solution (0.9% NaCl). For alveolar macrophages,

the lavage fluid was centrifuged at $300 \times g$ for 7 min and the cells were resuspended in culture medium.

Interstitial macrophages were obtained by using a modification of the enzymatic dispersion method previously reported [12,13]. Briefly, after bronchoalveolar lavages, the lungs were digested with 0.25% trypsin (T8003; Sigma) dissolved in 100 ml saline and suspended in 0.9% NaCl at 37 °C for 30 min. The trypsin was constantly topped up during the 30 min expansion of the parenchyma. After digestion, the lungs were chopped into 1–2 mm² cubes, treated with DNase dissolved in 7500 U/100 ml saline and filtered through nylon meshes ranging in pore size from 150 to 30 µm. The resulting cell suspension was centrifuged ($250 \times g$ for 20 min at 10 °C) through a sterile Percoll gradient and the monocyte cell-rich band was collected. A second DNase treatment (2000 U/100 ml) was administered and the cells were recovered as a pellet by centrifugation at $250 \times g$ for 20 min.

Both alveolar and interstitial macrophages were resuspended in RPMI-1640 culture medium containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Aliquots of about 3×10^6 cells were plated in six-well plates and cultured at 37 °C under a gas phase of air:CO₂ (95:5). After an attachment period of 2 h, the non-adherent cells were removed by shaking. The resulting adherent populations consisted of >98% alveolar macrophages and >92% interstitial macrophages. To evaluate the cell yield and purity, cytopsin preparations were stained with Diff-Quik (Diagnostics Grifols SA, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's protocol. Contaminating cells are mainly type II pneumocytes and ciliary cells.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA from cells was extracted using Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA was quantified by measurement of the absorbance at 260 and 280 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). cDNA was synthesized using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and reverse transcription was then performed on a 1 µg RNA sample by adding iScript reagents. The reaction was incubated at 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min and 85 °C for 5 min, and was then stored at –80 °C.

Subsequent PCR amplification was performed in a DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad) using IQTM SYBR Green Super mix and the corresponding rat primers (see supporting information, Table S1). Reactions were performed in duplicate and threshold cycle values were normalized to *GAPDH* gene expression. The specificity of the products was determined by melting curve analysis. The ratio of the relative expression of target genes to *GAPDH* was calculated by the ΔC_t formula.

SDS-PAGE and Western blot

Cells were lysed using the nuclear extract kit from Active Motif (Carlsbad, CA, USA) under conditions for preparation of nuclear and cytoplasmic extracts. SDS-PAGE was performed on 12% acrylamide gels. Proteins were electrotransferred to nitrocellulose membrane and probed with primary Ab (Anti-I κ B α ; Santa Cruz, CA, USA) at 1/1000. The membranes were incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary Ab, washed and then incubated with ECL reagents from Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, UK) before exposure to high-performance chemiluminescence films. Gels were calibrated using Bio-Rad standard proteins with markers covering a 7–240 kDa range. ImageJ 1.32 software (obtained from: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) was used to quantify the intensities of the bands obtained.

PPAR γ -DNA binding activity

The binding of PPAR γ to the peroxisome proliferator response element (PPRE), binding consensus sequence 5'-AACTAGGTCAAAGGTCA-3', was measured using the ELISA-based TransAm PPAR γ kit (Active Motif). The active forms of PPAR γ in nuclear extracts were detected by using specific antibodies for an epitope that is accessible only when it is activated and bound to its target DNA. Specificity was checked by measuring the ability of soluble wild-type oligonucleotides to inhibit binding.

Anti-rat macrophage monoclonal antibodies

To detect rat macrophages, we used two different monoclonal antibodies (Acris Antibodies, Herford, Germany): ED1 (mouse anti-rat CD68), which recognizes alveolar macrophages; and ED2 (mouse anti-rat CD163), which is normally expressed by interstitial lung macrophages but, in contrast to ED1, not by alveolar macrophages [14].

Immunohistochemistry

Rat lungs were infused with 10% buffered formalin for 24 h and embedded in paraffin. Then 5 μ m sections were prepared. After deparaffinization, the tissue sections were treated with sodium citrate for

30 min at 90 °C, incubated for 30 min in a solution containing 5% hydrogen peroxide and blocked with a solution of PBS, 3% fetal calf serum and 1% BSA for 2 h at room temperature.

The tissue sections were incubated overnight with anti-rat macrophages, ED1 (1 : 200) or ED2 (1 : 200), diluted in a solution containing 5% BSA. After washing with PBS-T (PBS and 0.2% Triton), they were incubated for 1 h at room temperature with biotinylated secondary antibodies (1 : 200). After rinsing in PBS, the slides were incubated for 1 h at room temperature with streptavidin-HRP diluted 1 : 200 in blocking solution. Diaminobenzidine was used as a substrate for the immunoperoxidase reaction. After rinsing with water, the sections were stained with haematoxylin. The number of macrophages was evaluated by counting cells over 15 fields by two different observers.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Means of different groups were compared by a one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's multiple comparison test was used to evaluate significant differences between groups. Differences were assumed to be significant at $p < 0.05$.

Results

Changes in macrophage subpopulations during acute pancreatitis

In control animals, alveolar macrophages, positive for ED-1, were observed in the alveoli (Figure 1A). Interstitial macrophages, positive for ED-2, were located in the pulmonary interstitium (Figure 2A). Both cell populations increased 24 h after pancreatitis induction (Figure 3). A large number of alveolar macrophages ED-1⁺ were observed in alveoli and the interstitium (Figure 1B). However, during pancreatitis some alveoli collapsed due to the degradation of lung surfactant [15] and macrophages were retained between collapsed alveolar walls. A similar increase was observed in the number of interstitial ED-2⁺ macrophages (Figures 2B, 3).

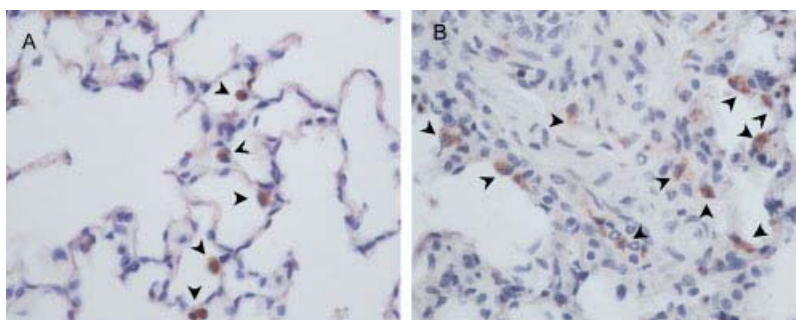


Figure 1. Changes in alveolar macrophages during pancreatitis. Immunohistological staining with ED1, showing the presence of alveolar macrophages (arrowheads) in (A) control animals and (B) 24 h after induction of pancreatitis (magnification, $\times 400$).

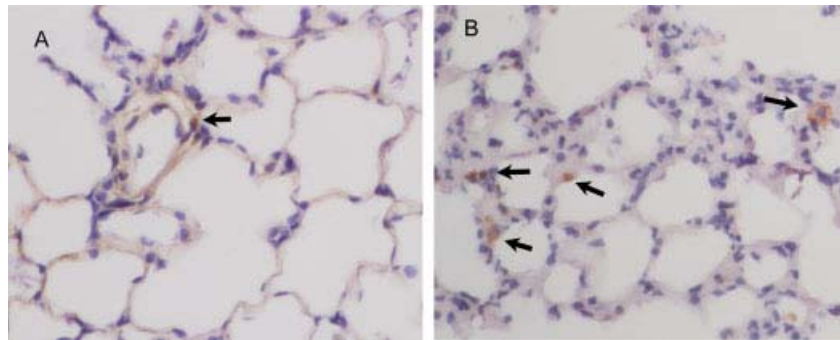


Figure 2. Changes in interstitial macrophages during pancreatitis. Immunohistological staining with ED2, showing the presence of interstitial macrophages (arrows) in (A) control animals and (B) 24 h after induction of pancreatitis (magnification, $\times 400$).

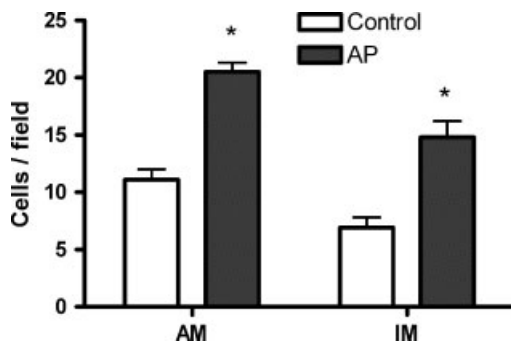


Figure 3. Changes in lung macrophage number during pancreatitis. Changes in the number of alveolar (AM) and interstitial (IM) macrophages 18 h after induction of pancreatitis. Vertical axis represents number of cells per field (mean of 15 fields) counted by two different observers. * $p < 0.05$.

Different activation phenotype of alveolar and interstitial macrophages during acute pancreatitis

When measuring the expression of markers for the different phenotypes in alveolar and interstitial macrophages (Figure 4), we found that after induction of pancreatitis alveolar macrophages adopted early M1 activation, characterized by the expression of pro-inflammatory mediators (TNF α and IL-1 β). These cytokines were strongly expressed 3 h after pancreatitis induction and were still expressed at 6 h, while 24 h after induction this expression returned to control values, whereas expression of M2a markers in alveolar macrophages only showed a moderate increase 6 h after induction. Finally, no changes were observed in the expression of M2b markers (IL-10 and CD163).

In contrast, interstitial macrophages did not express M1 or M2a markers at any time measured. This cell population showed an M2b phenotype, characterized by the increased expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10, 24 h after the induction of pancreatitis.

NF- κ B is activated only in alveolar macrophages

Induction of the expression of inflammatory mediators associated with M1 activation in alveolar macrophages suggests the involvement of the NF- κ B pathway. This was confirmed by measuring the degradation of the

inhibitory protein I κ B by western blot (Figure 5). Pancreatitis induction resulted in a rapid decrease in the I κ B protein level in alveolar macrophages but did not affect I κ B levels in interstitial macrophages.

Bronchoalveolar lavage from pancreatitis activates alveolar, but not interstitial, macrophages *in vitro*

To evaluate the response of alveolar and interstitial macrophages to the same stimulus, both cell populations obtained from control animals were incubated *in vitro* with the bronchoalveolar lavage obtained 3 h after pancreatitis induction. After centrifugation, the cell-free supernatant of bronchoalveolar lavage was added to the culture medium (50%). Then the RNA expression of TNF α was measured. Under these conditions, alveolar macrophages were activated and TNF α was induced 1 h and 3 h after the treatment. TNF α levels returned to control values 24 h after treatment. In contrast, no induction of TNF α expression was observed in interstitial macrophages (Figure 6).

PPAR γ is induced and activated in interstitial, but not in alveolar, macrophages during pancreatitis

An increase in the expression of PPAR γ mRNA was observed 3 h after pancreatitis induction in interstitial macrophages (Figure 7). This increase reached a higher level 6 h after induction and decreased to control levels at 24 h. When measuring the activation of PPAR γ by evaluating DNA binding activity in nuclear extracts of interstitial macrophages, we found a steady increase that achieved significant levels 24 h after induction (Figure 7). In contrast, no changes were observed in the activation and expression of PPAR γ in alveolar macrophages.

Discussion

Macrophages take on different phenotypes to regulate the induction and resolution of the inflammatory response. Here we evaluated the phenotypes of two different populations of lung macrophages after the induction of experimental acute pancreatitis. During the progression of acute pancreatitis, the pancreatic acinar

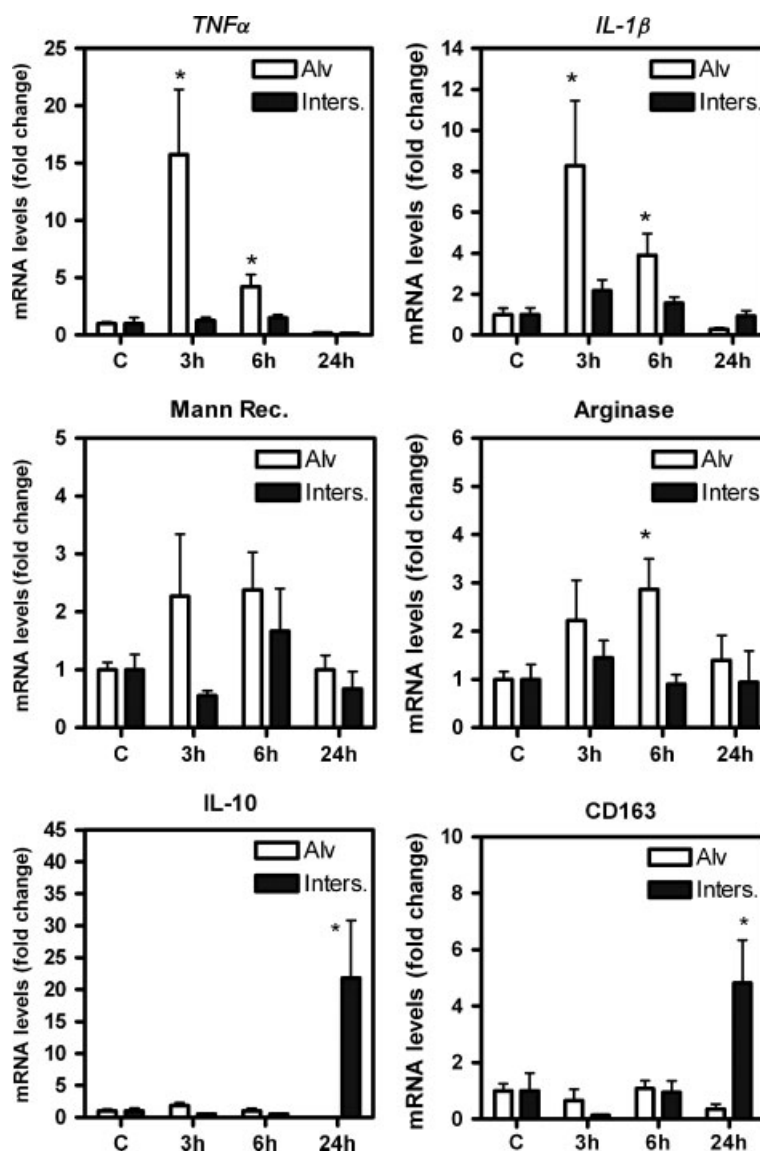


Figure 4. Pancreatitis induces different phenotypes in alveolar and interstitial macrophages. Changes in the mRNA expression of markers for the M1 phenotype (*TNFα* and *IL-1β*), M2a phenotype (*mannose receptor* and *arginase*) and M2b phenotype (*IL-10* and *CD163*) in alveolar and interstitial macrophages, evaluated by RT-PCR. The results, normalized to *GAPDH*, are expressed as increases over the control group. Pancreatitis induces early expression of M1 markers in alveolar macrophages and delayed expression of M2b markers in interstitial macrophages. * $p < 0.05$ versus control ($n = 6$).

cells release digestive enzymes and also inflammatory cytokines to the bloodstream. The presence of these mediators activates the inflammatory response at distant organs and, in severe forms of the disease, may result in tissue damage and loss of function [2].

During acute pancreatitis, alveolar macrophages have been reported to generate a number of inflammatory mediators, including *TNFα*, nitric oxide and reactive oxygen species [3]. The release of these mediators suggests that these cells acquire the inflammatory M1 phenotype that could be expected in the process of pancreatitis-associated acute lung injury. Our results are along these lines, showing the activation of alveolar macrophages characterized by the expression of inflammatory mediators such as *TNFα* and *IL-1β* (Figure 3). These mediators are characteristic of the inflammatory M1 phenotype and are involved

in the progression of the inflammatory response. This expression starts early but is not maintained for a long time; and the expression of these mediators returns to control values 24 h after pancreatitis induction. In contrast, we found a completely different response in interstitial macrophages. In these cells we observed a lack of M1 activation and a delayed acquisition of a regulatory M2b phenotype during the progression of acute pancreatitis (Figure 3). In this case, the expressions of *CD163* and of the anti-inflammatory cytokine *IL-10* were induced 24 h after the onset of the disease.

Expression of inflammatory mediators such as *TNFα* and *IL-1β* in alveolar macrophages but not in interstitial macrophages suggests that the NF-κB pathway in these cell populations is activated in different ways. We evaluated this activation by measuring the decrease in the *IκB-α* protein level (Figure 4) and

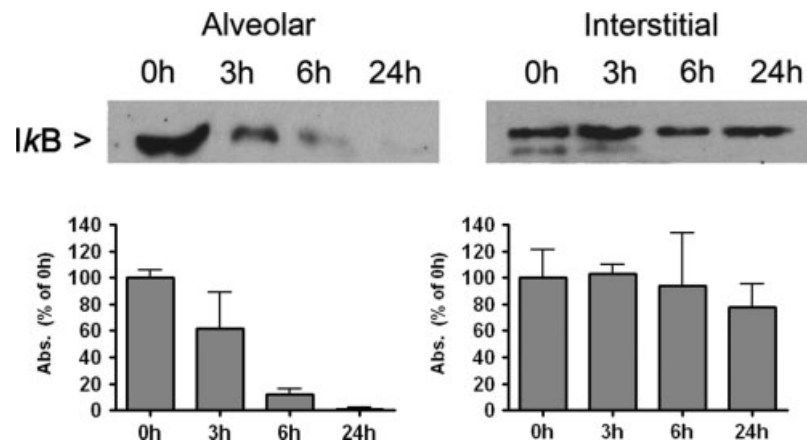


Figure 5. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation in alveolar macrophages. Western blot analysis revealed that acute pancreatitis results in rapid decrease in the $\text{I}\kappa\text{B}$ protein level in alveolar macrophages. In contrast, no changes were observed in interstitial macrophages. Figure representative (up) and mean of the intensities (down) of three independent experiments.

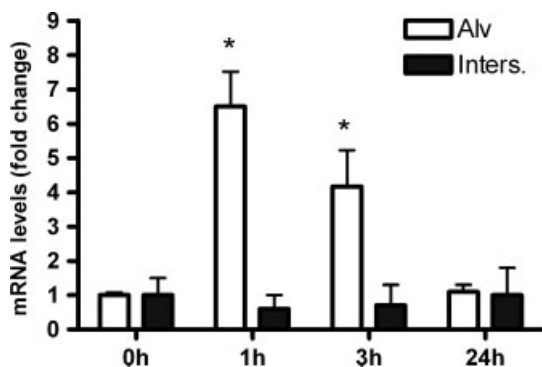


Figure 6. Different response between alveolar and interstitial macrophages *in vitro*. Alveolar and interstitial macrophages obtained from a control animal showed different activation when treated with bronchoalveolar lavage (BAL), obtained after induction of pancreatitis. The results, normalized to GAPDH , are expressed as increases over the control group and are the mean of three different experiments. Expression of $\text{TNF}\alpha$ was induced by BAL only in alveolar macrophages. * $p < 0.05$ versus control.

observed that this pathway became activated only in alveolar macrophages. Activation of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in alveolar macrophages during acute pancreatitis is not surprising, since severe acute pancreatitis also induces lung inflammation. Clearly, soluble mediators are released as a consequence of pancreatic damage and then circulate into the bloodstream to activate $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in macrophages in distant organs. However, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation was not observed in interstitial macrophages (Figure 4), indicating that these effects are specific to several cell populations. These results suggest that alveolar macrophages are involved in the induction of lung inflammation associated with acute pancreatitis, while the interstitial macrophages seem to play a role in the resolution of inflammation by activating the expression of anti-inflammatory mediators.

Under physiological conditions, alveolar and interstitial macrophages showed clear differences in the expression of different genes and in their responses to several agents. A number of studies have suggested

that interstitial macrophages are actually an intermediary stage in the maturation of alveolar macrophages [16]. These interstitial macrophages more closely resemble the circulating monocytes than the alveolar macrophages [17]. In addition, the two populations of macrophages are located in different compartments in the lung and, in consequence, are exposed to different microenvironments. To evaluate whether the differences observed between alveolar and interstitial macrophages during the progression of pancreatitis are related only to its location, we purified both alveolar and interstitial macrophages from a control animal and incubated these cells *in vitro* with the supernatant of bronchoalveolar lavage obtained from animals with pancreatitis. The results indicate that this stimulus induces the expression of $\text{TNF}\alpha$ in alveolar macrophages but has no effect on interstitial macrophages (Figure 5). This finding suggests that the different response observed during pancreatitis is not only related to the particular location of alveolar and interstitial macrophages.

Inhibition of the inflammatory response and the induction of an M2 phenotype in macrophages are strongly regulated by the activation of $\text{PPAR}\gamma$ [18,19]. This nuclear factor blocks the expression of inflammatory genes by interacting with $\text{NF-}\kappa\text{B}$, as well as inducing the expression of anti-inflammatory genes such as IL-10 [20,21]. It has been reported that deletion of $\text{PPAR}\gamma$ in alveolar macrophages results in a Th1-like inflammatory response that is characterized by cytokine generation similar to that in M1 inflammatory response [22]. Consequently, we measured the expression and the activity of this nuclear factor in both alveolar and interstitial macrophages (Figure 6). We found an increase in the RNA expression of $\text{PPAR}\gamma$ in interstitial macrophages, but no changes in alveolar macrophages. This expression was observed in the initial stages of pancreatitis and returned to control values 24 h after induction. In addition, there was a progressive increase in $\text{PPAR}\gamma$ DNA-binding activity in nuclear extracts of interstitial macrophages, but not

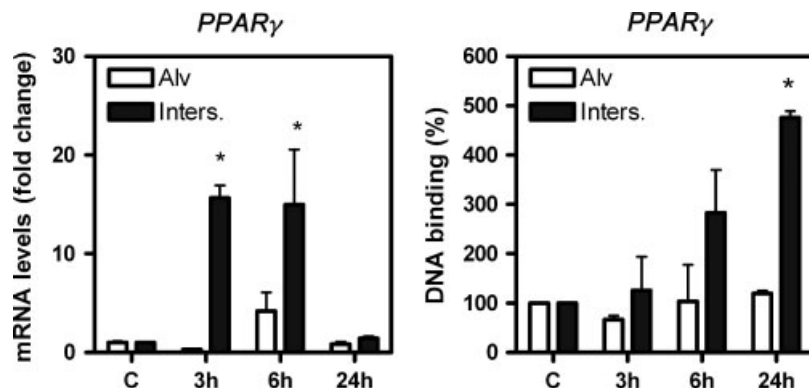


Figure 7. $PPAR\gamma$ activation in interstitial macrophages. $PPAR\gamma$ expression was induced only in interstitial macrophages after induction of pancreatitis (left). The results, normalized to $GAPDH$, are expressed as increases over the control group. Activation of $PPAR\gamma$, evaluated as DNA binding (right), was observed in interstitial macrophages and achieved significant values 24 h after pancreatitis induction. No changes were observed in alveolar macrophages. * $p < 0.05$ versus control.

in alveolar macrophages. This increase was significant only 24 h after pancreatitis induction.

There are several studies reporting that $PPAR\gamma$ agonists attenuate the severity of acute pancreatitis [23–25]; it has been claimed that the anti-inflammatory effects of $PPAR\gamma$ cause these beneficial effects. However, our results indicate that, in addition to the direct inhibition of inflammatory mediators, the induction of a regulatory M2b phenotype in selected macrophage populations could be an additional mechanism involved in the protective effects observed after $PPAR\gamma$ agonist administration.

In conclusion, our results indicate a clear difference between alveolar and interstitial lung macrophages during the progression of lung injury secondary to acute pancreatitis. During the progression of acute pancreatitis, a polarized M1 macrophage population of alveolar macrophages could be responsible for the pathophysiology of the disease, whereas the activation of interstitial macrophages to the anti-inflammatory M2b phenotype regulates the resolution of the process. Imbalance between these two cell populations could modify the severity of the pulmonary effects of acute pancreatitis. Moreover, these differences between alveolar and interstitial macrophages need to be taken into account when designing therapeutic strategies for the treatment of acute lung injury.

Acknowledgment

This research was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant No. SAF 2009-07605) and SEPAR (Grant No. 2009-841). Thanks are given to Valeria Sirenko for her technical support.

Author contributions

DC and ASM conceived the experiments and analysed the data. SGS and RG carried out the experiments. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

References

- Pezzilli R, Bellacosa L, Feliciani C. Lung injury in acute pancreatitis. *JOP* 2009; **10**: 481–484.
- Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; **175**: 76–83.
- Closa D, Sabater L, Fernandez-Cruz L, *et al.* Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 1999; **229**: 230–236.
- Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; **16**: 3995–4002.
- Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, *et al.* Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas* 2003; **27**: 253–260.
- Folch E, Prats N, Hotter G, *et al.* P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; **45**: 1535–1544.
- Tsukahara Y, Morisaki T, Horita Y, *et al.* Phospholipase A2 mediates nitric oxide production by alveolar macrophages and acute lung injury in pancreatitis. *Ann Surg* 1999; **229**: 385–392.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwrith KA, *et al.* Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006; **80**: 1298–1307.
- Higashi K, Naito M, Takeya M, *et al.* Ontogenic development, differentiation, and phenotypic expression of macrophages in fetal rat lungs. *J Leuk Biol* 1992; **51**: 437–443.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 958–969.
- Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; **15**: 411–416.
- Bilyk N, Mackenzie JS, Papadimitriou JM, *et al.* Functional studies on macrophage populations in the airways and the lung wall of SPF mice in the steady state and during respiratory virus infection. *Immunology* 1988; **65**: 417–425.
- Serrano-Mollar A, Nacher M, Gay-Jordi G, *et al.* Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 1261–1268.
- Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, *et al.* The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985; **54**: 589–599.
- Das SK, Scott MT, McCuiston S. Effects of experimental acute pancreatitis in dogs on metabolism of lung surfactant phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **145**: 612–618.

16. Sebring RJ, Lehnert BE. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Exp Lung Res* 1992; **18**: 479–496.
17. Dethloff LA, Lehnert BE. Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes. *J Leukoc Biol* 1988; **43**: 80–90.
18. Ricote M, Huang JT, Welch JS, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 733–739.
19. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007; **447**: 1116–1120.
20. Delerive P, DeBosscher K, Besnard S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors: NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem* 1994; **274**: 32048–32054.
21. Thompson PW, Bayliffe AI, Warren AP, et al. Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4⁺ T cells. *Cytokine* 2007; **39**: 184–191.
22. Malur A, McCoy AJ, Arce S, et al. Deletion of PPAR γ in alveolar macrophages is associated with a Th-1 pulmonary inflammatory response. *J Immunol* 2009; **182**: 5816–5822.
23. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, et al. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute pancreatitis induced by cerulein. *Intensive Care Med* 2004; **30**: 951–956.
24. Folch-Puy E, Granell S, Iovanna JL, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist reduces the severity of post-ERCP pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 6458–6463.
25. Griesbacher T, Pommer V, Schuligoi R, et al. Anti-inflammatory actions of perfluorooctanoic acid and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- α and - γ in experimental acute pancreatitis. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**: 325–329.

Supporting information on the internet

The following supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1. Rat primers used in RT-PCR

Estudi 3:

Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. Franco-Pons N, Gea-Sorlí S and Closa D. *The Journal of Pathology* 221:175-182 (2010)

L'Obesitat i el metabolisme dels lípids s'associen amb la severitat de la pancreatitis aguda. La necrosi grassa apareix en la PA severa com a conseqüència de l'alliberament d'enzims lipolítics, però la seva funció en la progressió de la malaltia no està clara. En aquest estudi, hem examinat el paper del teixit adipós blanc com a generador de mediadors inflamatoris que poden promoure inflamació sistèmica en la pancreatitis aguda experimental induïda amb taurocolat sòdic en rates.

Hem comparat l'efecte que té el teixit adipós blanc segons el seu origen sigui un animal control o d'un animal amb PA i si prové d'una zona no necròtica o d'una zona necròtica.

S'ha determinat l'estat inflamatori mesurant l'expressió de citocines com TNF α , iNOS, adiponectina i IL10. Per una altra banda, hem vist com afecta l'estat inflamatori del teixit adipós sobre macròfags peritoneals *in vitro* i si aquest teixit adipós inflammat allibera citocines a la circulació sistèmica.

Amb les histologies podem observar un importat infiltrat inflamatori al voltant de les zones necròtiques i del teixit adipós. Els resultats mostren que en les zones necròtiques hi ha més expressió de TNF α , iNOS i una reducció en l'expressió de IL10, mentre que l'adiponectina mostra un increment moderat. *In vitro*, la necrosi grassa indueix una forta activació M1 en macròfags peritoneals. Finalment, el mesenteri amb necrosi grassa allibera al torrent circulatori més quantitat de TNF α amb comparació amb les zones no necròtiques del mesenteri. Tot plegat indica que el teixit adipós blanc contribueix a la generació de mediadors potencialment involucrats en la inducció de la desposta inflamatòria sistèmica. En particular, les zones amb necrosi són importants alliberadors de mediadors inflamatoris.

Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis

Neus Franco-Pons, Sabrina Gea-Sorlí and Daniel Closa*

Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC-IDIBAPS, CIBEREHD[#], Barcelona, Spain

*Correspondence to: Daniel Closa, Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC, c/Rosselló 161, 7, Barcelona 08036, Spain
e-mail: dclbam@iibb.csic.es

[#]IIBB-CSIC, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; IDIBAPS, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer; CIBEREHD, Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas

Abstract

Obesity and lipid metabolism are associated with the severity of acute pancreatitis. Fat necrosis appears in the severe acute pancreatitis as a consequence of the release of lipolytic enzymes, but its potential role on the progression of the disease is unclear. In this study, we have examined the role of white adipose tissue as a source of inflammatory mediators that can promote systemic inflammation during experimental taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. The inflammatory status and the expression of TNF α , iNOS, adiponectin and IL-10 were determined in necrotic and non-necrotic areas of adipose tissue. Samples of adipose tissue were also used to induce the activation of macrophages *in vitro*. Finally, the release of TNF α to mesenteric vessels surrounded by necrotic or non-necrotic fat was evaluated in *ex vivo* perfused mesenterium. A strong inflammatory infiltrate was observed in the border between necrotic and non-necrotic areas of adipose tissue. In these areas, high expression of TNF α and iNOS and a reduced expression of IL-10 were observed, while adiponectin showed only a moderate increase. Necrotic fat strongly activates peritoneal macrophages *in vitro*. Mesenteric areas with fat necrosis release to the vascular vessels significantly increased amounts of TNF α when compared to vessels without necrosis. Altogether, these results indicate that adipose tissue inflammation is a process secondary to acute pancreatitis but also contributes to the generation of mediators potentially involved in the induction of the systemic inflammatory response. In particular, the areas of fat necrosis are important sources of inflammatory mediators. Copyright © 2010 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: adipose tissue; pancreatitis; fat necrosis; inflammation; SIRS; iNOS; TNF α ; IL-10

Received 28 September 2009; Revised 11 January 2010; Accepted 11 January 2010

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Acute pancreatitis is a substantial clinical problem with a broad spectrum of severity. The majority of patients show a mild, self-limited process, but 20% of patients develop the severe form of acute pancreatitis with high morbidity and mortality. This severe acute pancreatitis is characterized by the necrosis of pancreatic tissue and surrounding areas, followed by a massive inflammatory reaction with infiltration of neutrophils and macrophages. The extrapancreatic effects of this form include systemic inflammation, disseminated fat necrosis, acute lung injury and shock [1].

It is already known that obesity is an independent risk factor for a poor outcome in severe acute pancreatitis [2] but the intimate mechanism of this relationship remains unknown. It is known that obesity *per se* could induce a pro-inflammatory state, and it has been considered as a low-grade inflammatory condition [3]. Consequently, increasing interest has

been extended to the secretory products of adipocytes and it has been found that adipose tissues secrete numerous cytokines that are referred to as adipokines [4]. However, adipocytes are not the only source of inflammatory cytokines. Adipose tissue macrophages are suspected to play an important role in the onset of inflammation [5], followed by an increase in the recruitment of immune cells [6]. In this line, accumulation of immune cells within the adipose tissue has been demonstrated in mice models of obesity as well as in human patients [7].

In the context of acute pancreatitis, disseminated fat necrosis is a characteristic feature that appears in the severe forms of the disease. Fat necrosis is considered a consequence of the release of lipolytic enzymes from a damaged pancreas [8]. This adipose tissue damage could have an important effect on the activation of resident macrophages and in the dynamics of immune cells. This could be of particular relevance, since we have recently reported that oxidized lipids generated

during acute pancreatitis interferes with the regulation of the macrophages promoting an exacerbation of the inflammatory response [9].

It could be expected that fat necrosis promotes a strong infiltration of leukocytes in damaged areas of adipose tissue. In these conditions, the adipose tissue could become an important source of pro-inflammatory mediators participating in the progression of local abdominal damage to the systemic inflammatory response in the acute pancreatitis. Thus, it could be argued that, in acute pancreatitis, inflammation in adipose tissue could be involved in the worse prognosis observed in obese patients. With this rationale, we have undertaken studies to evaluate: (a) the inflammatory status in peritoneal white adipose tissue (WAT); (b) its correlation with fat necrosis; and (c) the involvement of these events on the generation of inflammatory mediators that contribute to systemic inflammatory response in severe acute pancreatitis.

Methods

Animals

Male Wistar rats, 250–300 g body weight (b.w.), were used in all experiments (Charles River, France). The animals were housed in a controlled environment, fed with standard laboratory pelleted formula (A04; Panlab, Barcelona, Spain) and tap water *ad libitum*. This study conformed to European Community regulations for the use of experimental animals and the institutional committee of animal care and research approved it.

Animal model of acute pancreatitis

The animals ($n = 6$ each group) were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) administration of sodium pentobarbital (50 mg/kg). The biliopancreatic duct was cannulated through the duodenum and the hepatic duct was closed by a small bulldog clamp. Pancreatitis was induced by retrograde perfusion of 5% sodium taurocholate (Sigma, St Louis, Missouri, USA) in a volume of 0.1 ml/100 g b.w., using a perfusion pump (Harvard Instruments, Edenbridge, UK) [10]. Control animals received an intraductal perfusion of saline solution. Eighteen hours after induction, samples of plasma, ascitic fluid, pancreas and necrotic as well as non-necrotic peritoneal WAT were obtained, immediately frozen and stored at -80°C until analysed. Tissue samples were also obtained for histological study. Finally, in some experiments, WAT tissue samples were obtained, washed with sterile PBS and used for co-culture experiments with macrophages.

Histological study

For histological studies, tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, paraplasm-embedded, cut into 5 μm thick sections and stained with haematoxylin and eosin (H&E) according to standard procedures. The sections were evaluated by light microscopy.

Immunohistochemistry

Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated and washed in PBS-TW, and then they were treated with 2% hydrogen peroxide, blocked with 10% FBS and incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibody against neutrophil elastase (Santa Cruz Life Technologies), diluted 1/50. After that, sections were sequentially incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1 : 200; Sigma) and avidin–biotin complex reaction (1 : 200, ABC Elite Kit, Vector Laboratories) and developed with a solution of 0.025% DAB in phosphate buffer, pH 7.4, and 0.005% H_2O_2 . The sections were dehydrated and mounted in DPX.

Rat peritoneal macrophages culture

Briefly, peritoneal macrophages were harvested by peritoneal washes with PBS containing heparin. Centrifuged cells were then suspended in RPMI1640 culture medium containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Aliquots of 500 000 cells were plated in 24-well plates and cultured at 37°C under a gas phase of air : CO_2 (95 : 5) [11].

In vitro rat peritoneal macrophage activation

Peritoneal macrophages were incubated in presence of tissue samples of WAT (70 mg/well) obtained from control animals or from the necrotic areas present after induction of pancreatitis. These necrotic samples included the border between necrotic and non-necrotic tissue. There was no direct contact between macrophages and tissue samples because the density of the adipose tissue makes it float. After incubation, tissue samples and culture medium were removed and the RNA of macrophages was obtained to evaluate the expression of $\text{TNF}\alpha$. In additional experiments, WAT tissue samples were incubated without macrophages for 24 h in order to measure the presence of inflammatory mediators (NO and lipoperoxides) in conditioned medium.

Mesenteric generation of inflammatory mediators

To evaluate the capacity of fat necrosis present in mesentery to release inflammatory mediators to the bloodstream, we designed an *ex vivo* experiment measuring the $\text{TNF}\alpha$ released in different areas of mesenteric vascular perfusate. Small bowel was isolated; the superior mesenteric artery was exposed, cannulated with PE-50 tubing (Clay-Adams, UK) and immediately perfused with 5 ml saline solution at 4°C . Then, the small bowel was removed and the mesenteric artery was perfused with 10 ml saline solution for 1 h. Eluent perfusate was collected from areas with or without the presence of fat necrosis around the blood vessels and the concentration of $\text{TNF}\alpha$ was evaluated.

Assays

Myeloperoxidase

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured photometrically with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate. Tissue samples were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM phosphate buffer at pH 6.0. Homogenates were sonicated and submitted to three cycles of snap-freezing in dry ice and thawing. Finally, samples were incubated at 60 °C for 2 h and then spun down at 4000 × g for 12 min. The supernatants were collected for MPO assay. Enzyme activity was assessed photometrically at 630 nm. The results are expressed as units (U) MPO activity/g protein [11].

Nitrite generation

Generation of NO by WAT explants was determined by measuring the nitrite concentration on the conditioned medium by the Griess reaction [12].

Lipoperoxides

Lipid peroxidation was determined by the thiobarbiturate reaction measuring the formation of thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS). For this purpose, 1 ml trichloroacetic acid (20%) was added to 1 ml sample. After mixing and centrifuging, 0.5 ml TBA solution in water was added to the supernatant and boiled for 60 min. Optical density was recorded at 530 nm.

Lipase

Plasma lipase was determined by using commercial turbidimetric assay kits from Randox (Antrim, UK), according to the supplier's specifications.

TNF α

TNF α concentration in conditioned medium and in mesenteric perfusate was measured using a commercial Kit for rat TNF α from BLK international (Badalona, Spain), according to the supplier's specifications.

RNA levels of inflammatory mediators

Total RNA from cells or tissue samples obtained at the border between healthy and necrotic tissue were extracted using the TRizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA was quantified by measurement of the absorbance at 260 and 280 nm, using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). cDNA was synthesized using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and reverse transcription was then performed on 1 μ g RNA sample by adding iScript reagents. The reaction was incubated at 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min and 85 °C for 5 min and then stored at -80 °C.

Subsequent PCR amplification was performed in a DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) using IQTM SYBR Green Super mix and the correspondent rat primers: TNF α , forward 5'-AACTCCCAGAAAAGCAAGCA-3', reverse 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'; iNOS forward 5'-CTTGGAGCGAGTTGTGGATT-3', reverse 5'-GGTGGGAGGGGTAGTGATG-3'; IL-10, forward 5'-CATCCGGGGTGACAATAA-3', reverse 5'-TGTC CAGCTGGTCCTTCT-3'; adiponectin, forward 5'-AA CTTGTGCAGGTTGGATGG, reverse 5'-CCTGTCAT TCCAGCATCTCC-3'; GAPDH, forward 5'-ATGACT CTACCCACGGCAAG-3', reverse 5'-GATCTCGCTC CTGGAAGATG-3'.

Reactions were performed in duplicate and threshold cycle values were normalized to *GAPDH* gene expression. The specificity of the products was determined by melting curve analysis. The ratio of the relative expression of target genes to *GAPDH* was calculated by using the $\Delta C(t)$ formula.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Means of different groups were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's multiple comparison test was performed for evaluation of significant differences between groups. Differences were assumed to be significant at $p < 0.05$.

Results

Pancreatic damage indicators

Eighteen hours after induction of pancreatitis, plasma lipase activity increased significantly (Table 1). However, the highest levels of lipase were found in ascitic fluid. In this compartment, the lipase concentration was one order of magnitude superior to that present in plasma.

The inflammatory response that occurs during acute pancreatitis was also corroborated by measuring MPO activity in pancreatic tissue and it was also significantly increased (Table 1).

Inflammation of WAT

Evaluation of MPO activity in WAT indicates a small but significant increase in non-necrotic areas of the tissue after induction of acute pancreatitis (Figure 1). However, MPO activity was highly increased when

Table 1. MPO activity (mU/mg prot) in pancreas and lipase activity (U/l) in plasma and ascitic fluid, 18 h after pancreatitis induction

	Control	Pancreatitis
MPO (pancreas)	0.62 \pm 0.10	1.32 \pm 0.15*
Lipase (plasma)	151 \pm 61	2943 \pm 346*
Lipase (ascitic fluid)	–	37509 \pm 3150

* $p < 0.05$ versus control.

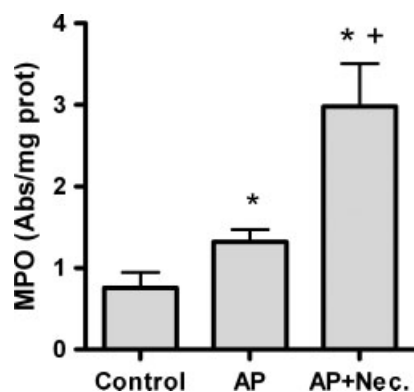


Figure 1. MPO activity in non-necrotic (AP) and necrotic (AP + necr.) WAT 18 h after induction of pancreatitis. * $p < 0.05$ versus control; +, $p < 0.05$ versus AP.

measuring the necrotic areas of WAT, suggesting a strong leukocyte infiltration in these areas.

Histological analysis confirmed the absence of inflammation in control animals (Figure 2A) but revealed a generalized presence of infiltrated inflammatory cells around the adipocytes (Figure 2B) as well as in the periphery of WAT (Figure 2C) during pancreatitis. Moreover, when necrotic areas of WAT were analysed, a dramatic accumulation of inflammatory cells were observed in the border between necrotic and non-necrotic adipose tissue areas (Figure 2D).

The multilobulated nucleus observed in the infiltrated cells suggests that these cells were mainly neutrophils. This has been confirmed by immunohistochemistry, using an anti-neutrophil elastase antibody. Infiltrated cells, in particular those in close vicinity to the necrotic areas, stained positive for the elastase neutrophil antibody, as shown in Figure 3 (arrowheads).

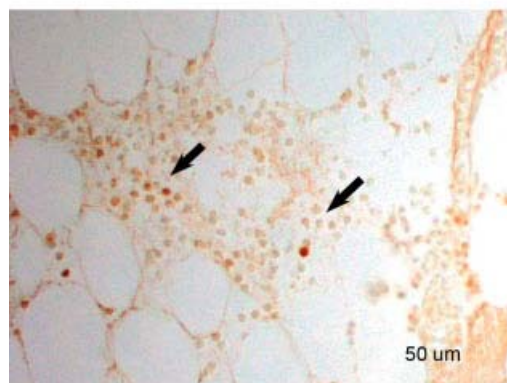
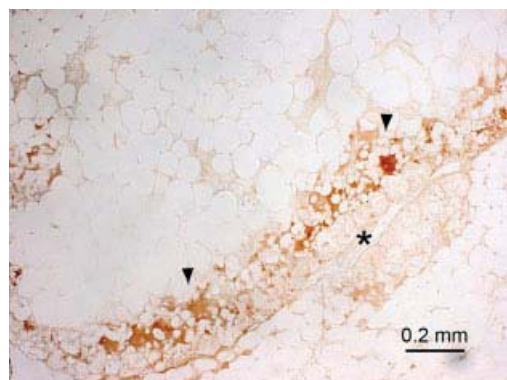


Figure 3. Presence of neutrophils in the infiltrated cells of WAT after pancreatitis induction. (A) Immunostaining of neutrophil elastase (arrowheads) could be observed in the border of necrotic area (*). Higher magnification (B) reveals the presence of positive cells (arrows) between adipocytes.

Expression of inflammatory mediators in WAT

The next step was to quantify the expression of inflammatory mediators in necrotic and non-necrotic areas of WAT samples by RT-PCR (Figure 4). No

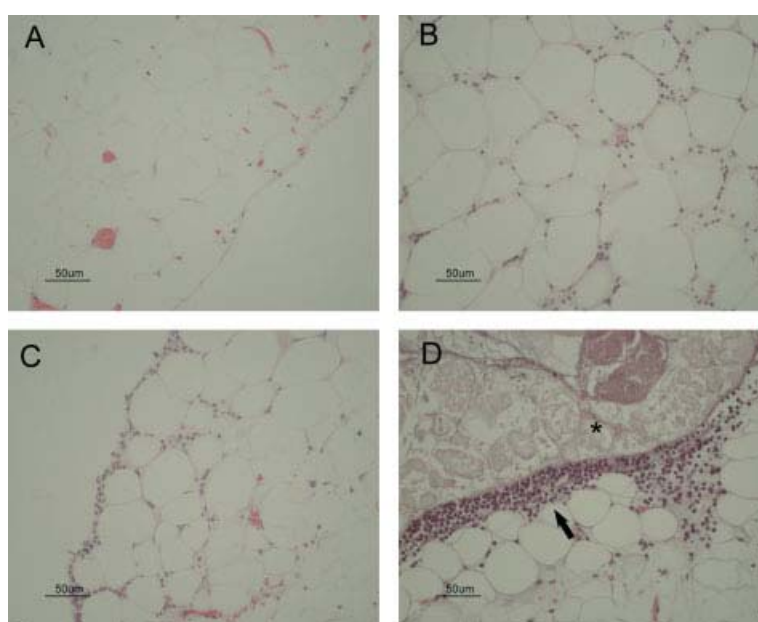


Figure 2. Histological analysis of WAT in control animals; (A) 18 h after pancreatitis induction (B, C) and in the border of the fat necrotic area (D). Pancreatitis promotes the influx of inflammatory cells that is more evident in the peripheral areas of the tissue. Maximal accumulation of inflammatory cells (arrow) was detected around the necrotic areas (*).

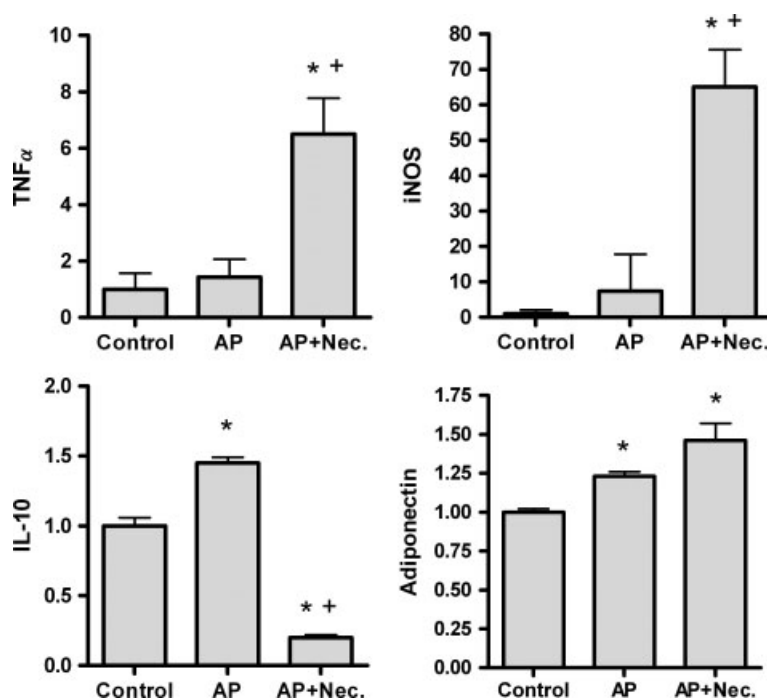


Figure 4. Expression of inflammatory mediators in non-necrotic (AP) and necrotic (AP + necrosis) WAT 18 h after induction of pancreatitis. * $p < 0.05$ versus control; +, $p < 0.05$ versus AP.

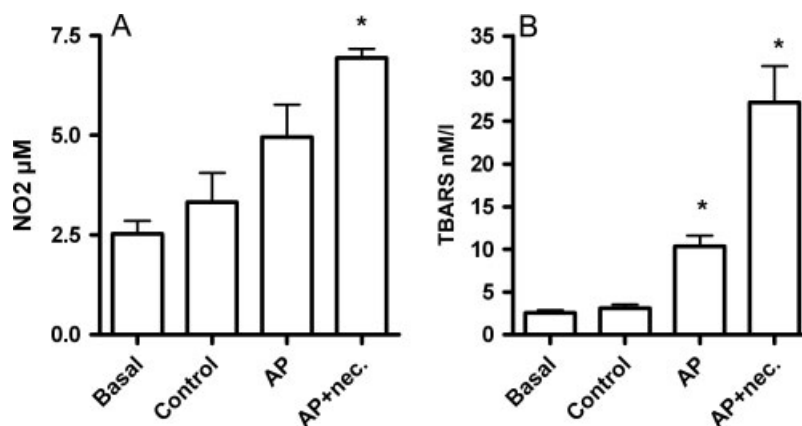


Figure 5. Nitric oxide generation was measured as nitrite (A) and lipoperoxides measured as TBARS (B) released to conditioned medium after 24 h incubation in non-necrotic (AP) and necrotic (AP + necr.) WAT obtained 18 h after induction of pancreatitis. * $p < 0.05$ versus control; +, $p < 0.05$ versus AP.

significant changes in TNF α and iNOS were observed in the non-necrotic areas of WAT after induction of pancreatitis. By contrast, the expression of these two genes was highly induced in the necrotic areas.

We also measured the changes in the anti-inflammatory mediators IL-10 and adiponectin. In non-necrotic areas a moderate induction of the expression was observed in both mediators. By contrast, in necrotic areas, IL-10 expression was strongly inhibited while adiponectin remains induced (Figure 4).

Release of inflammatory mediators to conditioned medium

To analyse the role of WAT as a source of inflammatory mediators, we generated WAT-conditioned medium by incubating tissue explants of WAT. Generation of nitric oxide was measured in conditioned medium after 24 h

of incubation. The results indicated that NO generation was increased in samples of acute pancreatitis when compared to controls. However, as occurred with MPO levels, the highest increase was observed in the necrotic samples of WAT (Figure 5A). Similar results were obtained when measuring the levels of lipoperoxides released to conditioned medium (Figure 5B).

WAT-induced macrophage activation

To evaluate the direct effect of WAT on macrophages, we incubated them in the presence of tissue explants of WAT. In these conditions, the expression of TNF α was strongly induced (Figure 6) in macrophages by the presence of necrotic areas of WAT.

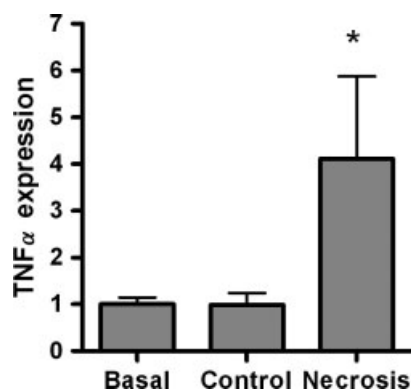


Figure 6. Effect of WAT samples on peritoneal macrophages. Induction of TNF α expression is significantly higher in necrotic fat, compared to non-necrotic WAT. * $p < 0.05$ versus control.

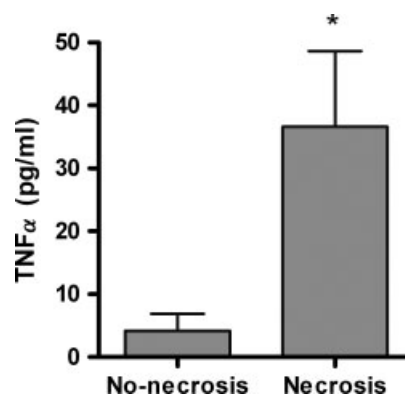


Figure 8. Levels of TNF α present in the eluate collected from non-necrotic or necrotic areas of mesenterium. * $p < 0.05$ versus non-necrotic.

Effect of fat necrosis on mesenteric release of TNF α

After pancreatitis induction, the mesenteric adipose tissue shows areas of fat necrosis surrounding the mesenteric vessels. For this reason, we have chosen the mesentery for evaluation of fat necrosis's ability to release inflammatory mediators to the bloodstream.

Histological studies showed a remarkable presence of inflammatory cells in areas of fat necrosis surrounding arteries (Figure 7D) or veins (Figure 7B). This situation allows an easy access to the bloodstream of mediators released by these inflammatory cells.

To confirm this possibility, we have also performed an *ex vivo* experiment collecting the eluate from the vessels from necrotic and non-necrotic areas of mesenterium. As shown in Figure 8, TNF α released to mesenteric vessels from necrotic areas achieved higher levels than that observed from vessels of non-necrotic areas.

Discussion

The results of the present study indicate that adipose tissue plays an important role as a source of inflammatory mediators in the severe forms of acute pancreatitis. In particular, the necrotic areas of WAT could contribute to the systemic inflammatory status observed in these patients, due to its capacity to generate large amounts of pro-inflammatory mediators (Figures 4, 5).

In pancreatitis, fat necrosis could be observed in peripancreatic, mesenteric and retroperitoneal fat. This process has been of interest for a long time and is connected with the effect on fat cells of lipase, phospholipase and other pancreatic enzymes [8]. However, its influence on the progression of the disease remains unclear.

We have recently demonstrated that free fatty acids, released to ascitic fluid by the action of lipase on the

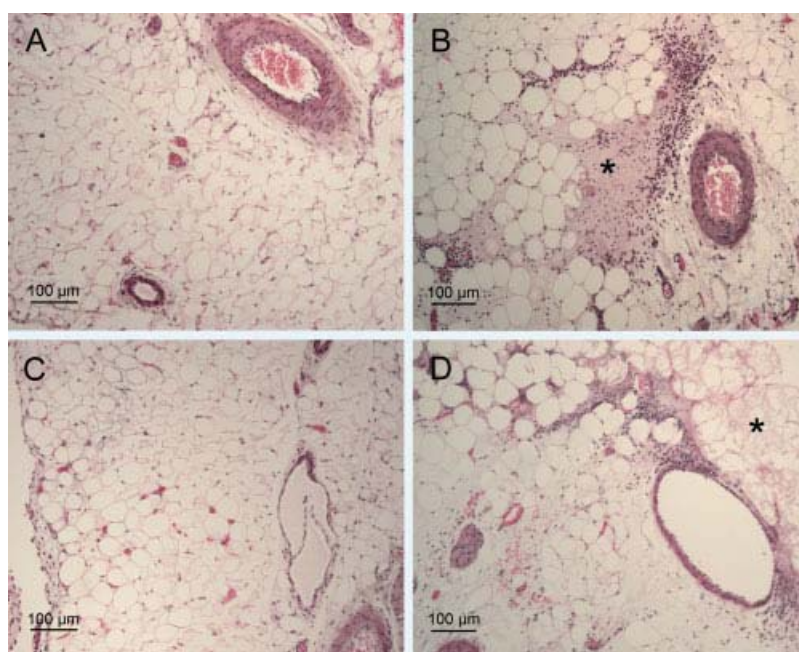


Figure 7. Perivascular infiltration in non-necrotic (A, C) and necrotic (B, D) mesenteric adipose tissue after pancreatitis induction. Note the accumulation of infiltrated cells surrounding the artery (B) or the vein (D) close to the fat necrotic areas (*).

adipose tissue, interferes with the regulatory mechanism in the inflammatory cells. Oxidized fatty acids released during pancreatitis could act as antagonists of nuclear receptor PPAR γ , thus reducing the induction of anti-inflammatory mediators and promoting a prolonged inflammatory status [9].

Consequently, it could be suspected that in areas of fat necrosis, where the generation of free fatty acids may be most important, the pro-inflammatory effects of fat-derived mediators could be more evident. This has been confirmed when measuring the inflammatory infiltrate in areas of fat necrosis. Histological analysis (Figures 2, 3) and MPO levels (Figure 1) revealed increased inflammation in adipose tissue after the induction of pancreatitis. This increase is particularly notorious in the border between the necrotic and non-necrotic areas, where the most dramatic increase of cell infiltrate could be observed.

This cell recruitment is associated with the expression of inflammatory mediators. Analysis of RNA expression (Figure 4) revealed a strong induction of TNF α and iNOS in necrotic areas of WAT, concomitant with a decrease in the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Interestingly, in absence of necrosis, there are no significant changes in the expression of these inflammatory mediators and only an increase in IL-10 could be observed, suggesting that it is the necrosis of adipose tissue that triggers the induction of the pro-inflammatory status. It is noteworthy that the expression of these mediators was observed in the areas with high numbers of inflammatory cells. This suggests that these cells could be the source of these mediators. In this line, when analysing the expression of adiponectin (Figure 3), which is an anti-inflammatory adipose cell-derived mediator [13], it could be observed a different profile, with a significant increase in non-necrotic areas and a subsequent increase in necrotic areas.

An important consequence of this inflammatory reaction in necrotic areas of adipose tissue could be the release of inflammatory mediators to the bloodstream. This fact could contribute to the development of a systemic inflammation associated with severe acute pancreatitis. To evaluate the ability of fat tissue to act as a source of these mediators, we incubated samples of WAT in culture medium for 24 h in order to obtain conditioned medium and analysed the presence of lipoperoxides and nitric oxide (measured as nitrite). We also measured the activation of cultured macrophages in the presence of tissue samples of WAT. Again the higher release of these mediators was observed when the medium was conditioned with necrotic WAT samples (Figure 5). In addition, incubation of peritoneal macrophages with WAT (Figure 6) results in the induction of TNF α expression only when the necrotic areas of adipose tissue are present.

Taken together, these data indicate that adipose tissue, and in particular the areas surrounding the necrotic tissue, is an important source of inflammatory mediators, with a potential role in the progression

of the systemic effects of acute pancreatitis. These results help to explain the clinical observations that link obesity with a worse prognosis of acute pancreatitis [2]. The high volume of adipose tissue in obese patients will result in increased areas that become sources of inflammatory mediators. On the other hand, pancreatic and mesenteric fat tissue were in close contact with the vascular system and mediators generated in these areas of fat necrosis could be easily released to the bloodstream, thus contributing to the activation of inflammatory cells in distant organs (Figure 7). It is considered that the circulating mediators present in the portal vein are mainly released by pancreatic tissue [14], but our results suggest that fat necrosis could be an important contributor to the release of these mediators.

To evaluate this possibility we designed an *ex vivo* experiment measuring the TNF α released in different areas of mesenteric vascular perfusate. Under these experimental conditions, pancreas was removed and the only source of this cytokine was the mesenterium and the fat surrounding it. This allowed us to measure the differences between areas with or without necrosis. The results showed that there is a significant increase in TNF α present in the vascular eluate collected from vessels with fat necrosis when compared with vessels without evident necrosis (Figure 8). It is of importance because inflammatory mediators released by these areas will achieve the liver via the portal system, resulting in the activation of hepatic macrophages [15] and amplification of the inflammatory response [16].

In conclusion, our results indicate that fat necrosis is not only a local inflammatory process, secondary to acute pancreatitis, but contributes to the generation of mediators potentially involved in the induction of the systemic inflammatory response during severe acute pancreatitis. This is due to the inflammatory reaction in the adipose tissue, rather than a direct response of adipocytes, and suggests that the control of fat inflammation could be of interest in preventing the subsequent systemic effects of severe acute pancreatitis.

Acknowledgment

This work was supported by Project No. SAF2006-08449 from Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

1. Klöppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1993; **8**: 659–670.
2. Sempere L, Martínez J, de Madaria E, Lozano B, Sanchez-Paya J, Jover R, *et al.* Obesity and fat distribution imply a greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis. *Pancreatol* 2008; **8**: 257–264.
3. O'Rourke RW. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery* 2009; **145**: 255–259.
4. Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; **3**: 716–724.

5. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007; **112**: 61–67.
6. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **384**: 482–485.
7. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 1304–1310.
8. Aho HJ, Sternby B, Nevalainen TJ. Fat necrosis in human acute pancreatitis. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1986; **94**: 101–105.
9. Gutierrez PT, Folch-Puy E, Bulbena O, Closa D. Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response. *Gut* 2008; **57**: 642–648.
10. Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; **15**: 411–416.
11. Gea-Sorlí S, Closa D. *In vitro*, but not *in vivo*, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. *BMC Immunol* 2009; **10**: 42.
12. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **222**: 27–32.
13. Tukiainen E, Kylanpaa ML, Ebeling P, Kempainen E, Puolakkainen P, Repo H. Leptin and adiponectin levels in acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; **32**: 211–214.
14. Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF- κ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002; **122**: 448–457.
15. Folch E, Prats N, Hotter G, López S, Gelpi E, Roselló-Catafau J, et al. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; **45**: 1535–1544.
16. Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, et al. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2000; **21**: 414–420.

Daniel Closa Autet com a director de la tesi doctoral presentada per Sabrina Gea Sorlí, faig constar que la doctoranda ha participat activament en la preparació dels articles presentats en aquesta tesi.

Sabrina Gea Sorlí va dur a terme el treball experimental, ha establert els models d'experimentació animal, ha participat en el disseny dels experiments en aquests estudis i ha contribuït en l'anàlisi crítica de les dades i resultats. També ha participat en la redacció dels articles.

El Factor d'Impacte SCI de les revistes on els articles han estat publicats es detallen a continuació:

Títol de l'article: **In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis**

Autors: **Gea-Sorlí S. and Closa D.**

Revista: ***BMC Immunology*. 10:42 (2009)**

Factor d'Impacte: **2.724**

Títol de l'article: **Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis**

Autors: **Gea-Sorli S, Guillamat R, Serrano-Mollar A and Closa D.**

Revista: ***The Journal of Pathology* 223:417-424 (2011)**

Factor d'Impacte: **6.466**

Títol de l'article: **Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis**

Autors: **Franco-Pons N, Gea-Sorlí S and Closa D.**

Revista: ***The Journal of Pathology* 221:175-182 (2010)**

Factor d'Impacte: **6.466**

Dr Daniel Closa Autet

DISCUSSIÓ

En aquest treball ens hem plantejat que el tipus d'activació que presenten les diferents poblacions de macròfags pot ser un factor determinant en l'evolució de la malaltia cap a la forma lleu o la severa. És possible que actuant sobre els macròfags es pugui modificar la polaritat que presenten i amb això, modular el procés inflamatori sistèmic associat a la pancreatitis aguda.

En aquesta tesi hem fet servir un model de PA severa experimental mitjançant l'administració intraductal de taurocolat sòdic al 5 % i ens hem centrat en els macròfags peritoneals i alveolars. Hem considerat aquestes poblacions de macròfags perquè els macròfags peritoneals estan en contacte directe amb el pàncrees i el líquid ascític associat a la PA mentre que els macròfags alveolars resulten interessants, ja que el pulmó és un dels òrgans més sensibles a aquesta malaltia. Respecte als períodes de temps triats, 3 h és suficient temps per a que, en aquest model, s'observin efectes sistèmics. A les 18 h la malaltia està ben establerta. Temps més llargs, amb aquest percentatge de taurocolat, implica una mortalitat molt alta en els animals.

El primer dels objectius d'aquesta tesi va ser caracteritzar el fenotip que la pancreatitis aguda induïa en els macròfags. Així doncs, després d'induir pancreatitis vam obtenir mostres, de macròfags peritoneals i alveolars per veure l'activació que presentaven i mostres de sang i de diferents teixits (pàncrees, pulmó i teixit adipós) per mesurar el dany pancreàtic i els efectes sistèmics que indueix aquesta malaltia.

Pel que fa a l'activació dels macròfags, hem observat que els macròfags peritoneals presenten una activació proinflamatòria o M1 al inici de la PA, reflectida en un increment en l'expressió de TNF α (marcador d'activació M1), mentre que no observem canvis en el receptor de la manosa (marcador d'activació M2). Aquest fenotip es manté fins 18 h després de la inducció de la malaltia. La reducció de l'expressió de TNF α entre aquest dos períodes de temps concorda amb la cinètica descrita per aquest gen en diferents experiments *in vitro*, quan els macròfags són estimulats amb mediadors proinflamatoris (Figura 12). El pic inicial de la generació de TNF α està seguit per l'expressió d'altres citocines com IL1 β , iNOS, etc. (Abbas HK i cols 2002)

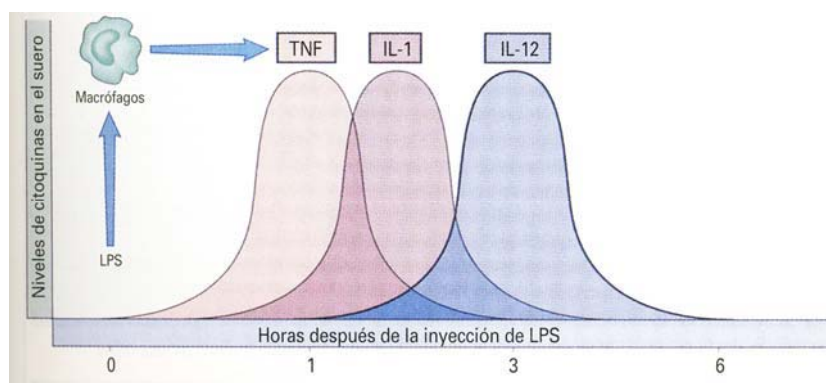


Figura 12: Cinètica de citocines. (Abbas HK i cols 2002)

Aquest fenotip M1 era el que esperàvem, ja que els macròfags peritoneals estan en la cavitat peritoneal, en contacte directe amb els mediadors proinflamatoris alliberats pel teixit pancreàtic i el líquid ascític com enzims hidrolítics, citocines, radicals lliures d'oxigen i de nitrogen, etc.

Hi ha treballs que descriuen la plasticitat del fenotip d'activació adquirit pels macròfags i la seva capacitat per ser reprogramats per l'efecte de citocines M1 i M2 (Wang Y i cols 2007; Zhang C i cols 2005). El següent pas va ser conèixer la capacitat d'aquestes cèl·lules amb fenotip proinflamatori o M1 per ser revertides a un fenotip antiinflamatori.

Això serà important cara a establir noves teràpies per aquesta malaltia. En aquesta idea, hem avaluat aquesta possibilitat *in vitro* mitjançant el tractament de macròfags peritoneals activats durant la PA amb una barreja de IL4 i IL13. Aquestes citocines se sap que induïxen una activació alternativa (Wang Y i cols 2007). Els nostres resultats indiquen que aquest tractament amb IL4 i IL13 canvia la polaritat induïda per la PA en els macròfags peritoneals, ja que en analitzar l'expressió dels gens d'activació vam observar una reducció en l'expressió de TNF α paral·lela al increment en l'expressió del receptor de la manosa.

Un cop comprovat que es pot revertir la polaritat induïda per la PA en els macròfags peritoneals *in vitro*, vam intentar modular els macròfags peritoneals *in vivo*. En aquest experiment, vam administrar IL4 i IL13 intraperitonealment, una hora després de la inducció de la pancreatitis. Dos hores més tard vam

avaluar per una banda, l'activació dels macròfags peritoneals i, per altra, la progressió del procés inflamatori. Aquest període de temps sabem que és curt per aconseguir un fenotip M2, però la ràpida progressió d'aquesta malaltia no ens permet prolongar el tractament. L'objectiu d'aquest experiment només era aconseguir una reducció en la intensitat de l'activació M1 que podria representar un decrement en la inflamació sistèmica.

El tractament amb interleuquines una hora després de la inducció de la PA, no va modificar el fenotip dels macròfags peritoneals, ja que aquests continuaven amb el fenotip M1 similar al que van adquirir els macròfags peritoneals dels animals no tractats. Respecte l'efecte d'aquest tractament amb interleuquines sobre el dany pancreàtic i la inflamació sistèmica, els resultats no mostraven canvis ni en els nivells de lipasa en plasma, ni en la inflamació del pàncrees mesurada com MPO, que continuaven molt elevats. Per contra, els resultats van mostrar una reducció significativa de la inflamació en pulmó i en teixit adipós no relacionada amb l'activació dels macròfags. Està descrit que en models experimentals de malalties severes, la IL4 pot regular l'activació del complement (Zhang C i cols 2005) o la generació de IL 10 en pancreatitis crònica (Brock P i cols 2006). Alguns d'aquests efectes podrien explicar la reducció en la inflamació que hem observat en el nostre experiment.

Sembla clar que el tractament amb interleuquines no és suficient per modular el fenotip M1 observat en els macròfags. Aquesta diferència entre els efectes observats *in vivo* i *in vitro* podrien explicar-se per l'acció de l'ambient proinflamatori generat per la pancreatitis en la cavitat peritoneal. Però també hi ha que tindre en compte l'efecte dels enzims hidrolítics que conté el líquid ascític sobre les citocines administrades. Per això, vam mesurar l'estabilitat de la IL4 en líquid ascític i en plasma. Els resultats mostraven que la interleuquina es degrada molt més ràpid en líquid ascític comparat amb el plasma, suggerint que els enzims hidrolítics efectivament degraden els tractaments intraperitoneals. Això suggereix que qualsevol tractament d'aquest tipus caldria fer-ho amb rentats previs per eliminar el líquid ascític.

Una altra població interessant per estudiar el seu fenotip van ser els macròfags pulmonars. Tot i que, habitualment es fan estudis sobre els macròfags alveolars, també s'ha descrit la presència dels macròfags intersticials; una altra població de macròfags al pulmó.

Així doncs, vam fer un altre experiment, aquesta vegada al 3.5 % de taurocolat sòdic, per poder augmentar el temps d'evolució de la malaltia (3, 6 i 24 hores). Les immunohistoquímiques ens van mostraven la diferent localització d'aquestes dues poblacions de macròfags i que el nombre d'aquestes cèl·lules augmentava amb la pancreatitis.

Seguidament, vam posar apunt la tècnica per aïllar els macròfags intersticials. Treballar amb macròfags alveolars és relativament fàcil perquè amb rentats broncoalveolars es poden treure gran quantitat d'aquestes cèl·lules amb una puresa molt elevada, mentre que obtenir els macròfags intersticials implica digerir l'òrgan i seleccionar els macròfags intersticials primer amb un gradient de densitat i després per adhesió.

A l'hora de caracteritzar aquests macròfags, vam ampliar el nombre de marcadors per definir millor la polaritat que adopten. L'activació clàssica o M1 es caracteritza per presentar una inducció de mediadors proinflamatoris com el $TNF\alpha$, la $IL1\beta$. Els macròfags activats alternativament (M2), són més difícils de classificar perquè aquesta activació indueix almenys 3 fenotips diferents solapats (M2a, M2b, M2c). En general, s'està utilitzant com a classificació consens la proposada per Mantovani al 2004. En aquesta classificació els macròfags estimulats per les citocines tipus IL4 i IL13 s'anomenen M2a, i es caracteritzen per induir l'expressió de molècules com el receptor de la manosa i l'arginasa-I i participar en processos de reparació i remodelació de teixits. D'altra banda, els macròfags activats per immunocomplexes i alguns lligands dels TLR reben el nom de M2b. Aquests macròfags participen en processos relacionats amb al·lèrgies, asma i processos en defensa contra patògens extracel·lulars. Finalment, els macròfags activats per la presència de IL10, glucocorticoides i $TGF\beta$, són els M2c i tenen induïda l'expressió de gens com la IL10 i el CD 163, entre d'altres. Aquests macròfags participen en processos de

immunoregulació, inhibint o bloquejant l'activació clàssica o M1. (Mantovani A i cols 2004).

Aquesta falta de consens en la nomenclatura fa que a la literatura es trobin diferents noms per al mateix fenotip. Nosaltres mateix, al manuscrit del primer article vam denominar M2b als macròfags que segons Mantovani serien els M2c.

Treballs anteriors del grup descriuen que durant la pancreatitis els macròfags alveolars generen gran quantitat de mediadors inflamatoris (TNF α , ON, RLO, etc) (Closa D i cols 1999). L'alliberament d'aquests mediadors ja suggeria que aquests cèl·lules adquireixen un fenotip M1 o proinflamatori, cosa que esperem durant el dany pulmonar associat a la pancreatitis. Els nostres resultats, efectivament han confirmat que els macròfags alveolars mostren una activació caracteritzada per l'expressió de mediadors proinflamatoris com el TNF α i la IL1 β , característic d'un fenotip M1 i estan associats amb la progressió de la resposta inflamatòria. Aquesta expressió comença al inici però no es manté durant molt de temps; ja que l'expressió d'aquests marcadors torna a valors de control a les 24 hores de la inducció de la PA. Per una altra banda, hem trobat una resposta completament diferent en els macròfags intersticials. En aquestes cèl·lules hem observat l'adquisició d'un fenotip regulador o M2c durant la progressió de la PA. En aquest cas, l'expressió de CD163 i de IL10 estaven induïts 24 h després de començar la malaltia.

L'expressió de mediadors inflamatoris com el TNF α i la IL1 β en macròfags alveolars però no en els macròfags intersticials suggereix que la via de NF- κ B en aquestes poblacions cel·lulars està activada de diferent manera. Hem avaluat aquesta activació mesurant la degradació de la proteïna I κ B- α i hem pogut observar que NF- κ B està activat sols en macròfags alveolars. Aquest resultat reforça la idea de que els mediadors solubles alliberats com a conseqüència del dany pancreàtic a la circulació sanguínia, activen NF- κ B en òrgans a distància. Tot i això, NF- κ B no està activat en els macròfags intersticials, indicant que aquests efectes són específics de diferents poblacions cel·lulars.

Tot plegat suggereix que els macròfags alveolars estan involucrats en la inducció de la inflamació pulmonar associada a la PA, mentre que els macròfags intersticials podrien estar implicats en la posterior resolució de la inflamació, induïnt l'expressió de mediadors antiinflamatoris.

Sota aquests condicions patològiques, els macròfags alveolars i els intersticials mostren clares diferències en l'expressió de diferents gens i en la seva resposta a diferents agents. Hi ha estudis que proposen que els macròfags intersticials són actualment un estat intermig en la maduració dels macròfags alveolars (Sebring RJ i cols 1992). Aquests macròfags intersticials se semblen més als monòcits de la sang que als macròfags alveolars (Dethloff LA i cols 1988). A més a més, les dues poblacions de macròfags estan localitzades en diferents compartiments dins del pulmó i, en conseqüència, estan exposats a diferents microambients.

Per avaluar si les diferències observades entre els macròfags alveolars i intersticials durant la progressió de la PA estan associades a la localització o són dues poblacions diferents, vam aïllar les dues poblacions de macròfags alveolars i intersticials, i vam incubar aquestes cèl·lules *in vitro* amb un únic estímul: el sobrenedant d'un rentat broncoalveolars d'un animal amb pancreatitis. En aquestes condicions s'indueix l'expressió de TNF α en els macròfags alveolars però no té aquest efecte en els macròfags intersticials. El fet de tenir un efecte diferent en resposta a un mateix estímul i sota les mateixes condicions suggereix que la resposta observada durant la PA no està únicament associada a la localització dels macròfags alveolars i intersticials, sinó que respon al fet de ser dues poblacions amb característiques diferenciades.

La inhibició de la resposta inflamatòria i la inducció d'un fenotip M2 en macròfags està regulada per l'activació de PPAR γ (Ricote M i cols 1998; Odegaard JI i cols 2007). Aquest factor nuclear bloqueja l'expressió de gens proinflamatoris bloquejant NF- κ B i induïnt l'expressió de gens antiinflamatoris com la IL10 (Delerive P i cols 1994; Thompson PW i cols 2007). S'ha descrit

que la deleció de PPAR γ en macròfags alveolars genera una resposta M1 caracteritzada per la generació de citocines similar a la resposta inflamatòria M1 (Malur A i cols 2009). Per veure si una inhibició de l'activitat PPAR γ és la via implicada en el fenotip M1 que adopten els macròfags alveolars, vam mesurar l'expressió d'aquest factor nuclear en aquestes poblacions de macròfags. Vam trobar un increment en l'expressió de PPAR γ en macròfags intersticials, però no vam observar canvis en els macròfags alveolars. Aquesta expressió s'observava al inici de la PA i tornava a nivells control 24 h després de la inducció. A més a més, hi havia un increment progressiu en la unió al DNA per part del PPAR γ en extractes nuclears de macròfags intersticials, mentre que no trobem diferències en els extractes nuclears dels macròfags alveolars. Aquest increment és significatiu sols 24 h després de la inducció.

Els nostres resultats van mostrar una clara diferència entre els macròfags alveolars i els intersticials durant la progressió de la lesió pulmonar associat a la PA. Durant la progressió de la PA, els macròfags alveolars presenten un fenotip M1 que podria ser el responsable de la patologia pulmonar associada a aquesta malaltia, mentre que els macròfags intersticials presenten un fenotip M2c antiinflamatori que regularia la resolució del procés. El balanç entre aquestes dues poblacions cel·lulars podria modificar la severitat dels efectes pulmonars de la PA. Així doncs, aquestes diferències entre els macròfags alveolars i els intersticials podrien ser una possible diana terapèutica per al tractament del dany pulmonar associat a la PA.

Un altre objectiu que ens vam plantejar va ser, determinar els possibles mediadors implicats en la polaritat dels macròfags durant la PA. Treballs anteriors del grup, descriuen que els mediadors lipídics presents en el líquid ascític associat a la pancreatitis poden activar els macròfags. D'altra banda, la necrosi del teixit adipós blanc característica de la pancreatitis aguda, apareix com a conseqüència de l'alliberament d'enzims lipolítics. En aquest estudi es va avaluar el paper que té el teixit adipós com a font de mediadors inflamatoris durant la pancreatitis induïda amb taurocolat en rates.

Així doncs, després d'induir PA, vam obtenir mostres de teixit adipós blanc d'animals control i teixit adipós blanc d'animals amb PA diferenciant entre les zones sense necrosi i zones amb necrosi. Vam avaluar l'estat inflamatori d'aquests teixits mesurant l'activitat MPO, NO_2^- i MDA. Els resultats van mostrar un increment en aquests paràmetres inflamatoris en el teixit adipós provinent de pancreatitis que s'intensifica quan la zona està necròtica. Això coincideix amb una infiltració de leucocits més important en les zones necròtiques, que observàvem en les histologies.

També vam analitzar per PCR a temps real, l'expressió de diferents gens en zones necròtiques i no necròtiques del teixit adipós. Vam observar que hi havia una forta expressió de gens proinflamatoris ($\text{TNF}\alpha$, iNOS), una reducció de gens antiinflamatoris (IL10) i un increment moderat dels nivells de mRNA de l'adiponectina respecte al teixit adipós provinent de rates control.

Un cop vam veure que el teixit adipós estava inflammat i que té la capacitat de generar mediadors proinflamatoris, caldria veure si aquests mediadors realment activen els macròfags. Vam incubar macròfags peritoneals de rata basal amb un medi condicionat fet amb extractes de TAB basal, TAB d'una rata amb pancreatitis sense necrosi i TAB d'una zona amb necrosi. El resultat indicava que macròfags peritoneals basals incubats amb medi condicionat provinent d'un explant d'una zona sense necrosis presentaven una inducció del $\text{TNF}\alpha$, característic d'un fenotip M1 proinflamatori. Aquesta inducció del $\text{TNF}\alpha$ era molt més intensa quan el medi condicionat provenia d'un explant d'una zona amb necrosis

Totes aquestes dades indiquen que, el teixit adipós, i en particular la zona al voltant de la necrosi, és una font de mediadors inflamatoris amb un possible paper en la progressió dels efectes sistèmics associats a aquesta malaltia. Aquest resultat podrien ajudar a explicar les observacions clíniques que relacionen l'obesitat amb un factor de mal pronòstic en la PA.

Per una altra banda, hi ha zones del teixit adipós peripancreàtic i mesentèric que estan en íntim contacte amb el sistema vascular. En aquestes zones, quan apareix necrosi grassa, el TAB podria alliberar fàcilment mediadors al torrent circulatori i contribuir a l'activació de cèl·lules inflamatòries en òrgans distants.

Per avaluar aquesta possibilitat, vam dissenyar un experiment *ex vivo*, mesurant el TNF α alliberat en diferents zones (necròtiques i no necròtiques) del teixit mesentèric vascular. A les 6 h d'haver induït PA, vam treure el paquet intestinal i vam seleccionar zones del mesentèric amb necrosi i sense. Després vam canular la vena mesentèrica i vam perfondre aquesta zona amb sèrum fisiològic. Vam treure el intestí i vam recollir l'eluat en diferents tubs, diferenciant entre vasos amb necrosi i sense. Al final, vam mesurar el TNF α com a exemple de mediador inflamatori. Els resultats mostraven un increment significatiu dels nivells de TNF α en els eluats vasculars de zones amb necrosi comparat amb zones no necròtiques. Aquest resultat són importants per confirmar que el TAB afectivament allibera mediadors al torrent circulatori. Aquests mediadors proinflamatoris poden arribar al fetge via vena porta (Folch E i cols 2000), activant les cèl·lules de Kupffer (macròfags hepàtics) i amplificar la resposta inflamatoria (Gloor B i cols 2000).

Aquests resultats indiquen que la necrosi grassa no sols és un procés inflamatori local, secundari a la PA, sinó que pot contribuir a la generació de mediadors potencialment involucrats en la inducció de la resposta inflamatòria sistèmica durant la PA severa. En aquest sentí, controlar la inflamació del teixit adipós podria ser molt important per previndre el subseqüent efecte sistèmic de la pancreatitis aguda severa.

CONCLUSIONS

- Els macròfags peritoneals adopten una activació proinflamatoria al principi de la PA. Aquests macròfags poden ser reprogramats *in vitro* cap a un fenotip M2 o antiinflamatori, encara que *in vivo*, aquest tractament no és suficient per revertir el fenotip. Aquesta falta d'efecte sembla estar relacionada amb la degradació de les interleuquines per l'acció de líquid ascític present en la cavitat peritoneal.
- Al pulmó, els macròfags alveolars adopten un fenotip M1 regit per l'activació de la via de NF- κ B, al principi de la malaltia, mentre que els macròfags intersticials mostren l'adquisició d'una polaritat reguladora o M2c més bé cap al final de la progressió de la PA, associada a l'activació de la via de PPAR γ . Aquestes dades suggereixen que els macròfags alveolars estan involucrats en la inducció de la inflamació associat a la PA, mentre que els macròfags intersticials pareixen estar implicats en la resolució de la inflamació, induïnt l'expressió de mediadors antiinflamatoris.
- La necrosi grassa no és únicament un procés inflamatori local, secundari a la PA, sinó que contribueix a la generació de mediadors que activen als macròfags i que estan potencialment involucrats en la inducció de la resposta inflamatòria sistèmica durant la PA severa.

BIBLIOGRAFIA

- **Abbas HK**, Linchtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. *McGraw-Hill. Interamericana*. 2002; 4ed. 263pp
- **Acioli JM**, Isobe M, Kawasaki S. Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis; participation of trypsin. *Surgery* 1997;122:909-917.
- **Aho HJ**, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:411-416
- **Algul H**, et al. Acute experimental pancreatitis and NF-KappaB/Rel activation. *Pancreatology*. 2002; 2:503-509
- **Balachandra S**, Virlos IT, King NK, Siriwardana HP, France MW, Siriwardana AK. Hyperlipidaemia and outcome in acute pancreatitis. *Int. J Clin Pract* 2006; 60:156-159
- **Ballidin G**, Beger HG, Buchler M, editors. Release of vasoactive substances in ascites and blood in acute pancreatitis. In: Acute pancreatitis, research and clinical management. Berlin: *Springer-Verlag*, 1987; p.63-70.
- **Bardeesy N**, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* . 2002; 2:897-909
- **Bender AT**, Ostenson CL, Giordano D, Beavo JA. Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. *Cell Signal*. 2004;16 :365-374.
- **Berrebi D**, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 2003; 101:729-738.
- **Blum T**, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lankisch PG. Fatal outcome in acute pancreatitis: its occurrence and early prediction. *Pancreatology*. 2001; 1:237-241
- **Bradley E.L.** III. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the international Symposium on Acute pancreatitis, Atlanta, Ga. *Arch. Surg*. 1992; 128, 586-590

- **Brad D.J.**, Lillemoe K.D., Yeo C.J., Warfield P.B. I Hruban R,H. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22:163-169
- **Brock P**, Sparmann G, Ritter T, Jaster R, Liebe S, Emmircih J. Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 into pancreatic stellate cells promotes interleukin-10 expression. *J Cell Mol Med* 2006, 10:884-895.
- **Bronte V**, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 2003; 24:302-306.
- **Buchler M**, Malfertheiner P, Schadlich H, Nevalainen TJ, Friess H, Beger HG. Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1989;97:1521-1526.
- **Buter A**, Imrie WC, Carter CR, Evans S and McKay CJ. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis." *Br J Surg* 2002; 89: 298-302.
- **Cheung DL**, Hart PH, Vitti GF, Whitty GA, Hamilton JA. Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. *Immunology* 1990; 71:70-75
- **Chiari H**. Uber selbstverdaung des Menschlichen Pancreas. *Zeitschrift für Heilkunde* 1986; 17: 69-96
- **Chomarat P**, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1:510-514.
- **Cnop M.**, Hannaert JC, Hoorens A., i cols. Inverse relationship between cytotoxicity of FFA in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 2001; 50: 1771-1777
- **Closa D**, Hotter G, Rossello-Catafau J, Bulbena O, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Prostanoids and oxygen free radicals in early stages of experimental acute pancreatitis. *Digest Dis Sci* 1994; 39: 1537-1543
- **Closa D**, Rossello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Prostaglandin D2, F2 alpha, E2 and E1 in early phase of experimental acute necrohemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 1994; 9: 73-77

- **Closa D**, Bardaji M, Hotter G, Prats N, Gelpi E, Fernandez-Cruz L and Rosello-Catafau J Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol* 1986; 270: G6-13.
- **Closa D**, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpi E and Roselló-Catafau J. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 1999; 229: 230-236.
- **Collart MA**, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four κB-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-κB. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1498-1506.
- **Corraliza IM**, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 667-673.
- **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
- **De Beaux AC**, Palmer KR, Carter DC. Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases. *Gut*. 1995; 37:121-126
- **De Beaux AC**, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KCH. Serum concentration of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83: 349-353.
- **De Campos T**, Deree J, Coimbra R. From acute pancreatitis to end-organ injury: mechanisms of acute lung injury. *Surg Infect (Larchmt)*. 2007; 8: 107-120.
- **de Waal MR**, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, and de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-1220.
- **Denhain W**, Yang J, Fink G, Zervos EE, Carter G, Norman J. Pancreatic ascites as a powerful inducer of inflammatory cytokines. The role of known vs unknown factors. *Arch Surg* 1997; 132: 1231-1236.

- **Delerive P**, DeBosscher K, Besnard S. et al. Peroxisome proliferator activated receptor- γ negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors: NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem* 1994; 274: 32048-32054
- **Dervenis C.**, Assessments of severity and management of acute pancreatitis based on the Santorini Consensus Conference report. *JOP*. 2000; 1, 178-182
- **Desreumaux P**, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid x receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) heterodimer:a basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001; 193: 827-838.
- **Desvergne B**, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688.
- **Dethloff LA**, Lehnert BE. Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Leukoc Biol* 1988; 43: 80-90
- **Dijkstra CD**, Döpp EA, Joling P et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulation in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985; 54: 589-599
- **Dziurkowska-Marek A.**, Marek TA, Nowak A, Kacperek-Hartleb T, Sierka E, Nowakowska-Dolana E. The dynamics of the oxidant-antioxidant balance in the early phase of human acute biliary pancreatitis. *Pancreatology*. 2004; 4: 215-22
- **Edelson J. D.**, Vadas P, Villar J, Mullen JB and Pruzanski W. Acute lung injury induced by phospholipase A2. Structural and functional changes. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1102-1109.
- **Edwards JP**, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage population. *J Leukoc. Biol*. 2006; 80: 1298-1307
- **Elhelu MA**. The role of macrophages in immunology. *J Natl Med Assoc*. 1983 ;75: 314-317.

- **Feddersen CO**, Willemer S, Karges W, Puchner A, Adler G and Wichert PV. Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. Functional studies. *Int J Pancreatol* 1991; 8: 323-331.
- **Fitz HR**. Acute pancreatitis. Boston. *Med Surg.J.* 1889; 70:181-235
- **Folch E**, Salas A, Panes J, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Anderson DC, Navarro S, Pique JM, Fernandez-Cruz L and Closa D. Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg* 1999; 230: 792-798;
- **Folch E**, Prats N, Hotter G, Lopez S, Gelpi E, Rosello-Catafau J and Closa D. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000a; 45: 1535-1544.
- **Folch E**, Garcia-Montero A, Iovanna J, Dagom JC, Prats N, Vaccaro MI, Closa D. The pancreatitis-associated proteina induces lung inflammation in the rat through activation of TNF-alpha expression in hepatocytes. *J Pathol.* 2003; 199:398-408.
- **Fujita M**, Masamune A., Satoh A. Ascites of a rat experimental model of severe acute pancreatitis induces lung injury. *Pancreas* 2001;22:409-418
- **Gelman L**, Zhou G, Fajas L, Raspé E, Fruchart JC, Auwerx J. p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem* 1999; 274: 7681-7688.
- **Gilgenast O**, Brandt-Nedelev B, Wiswedel I, Lippert H, Halangk W, Reinheckel T. Differential oxidative injury in extrapancreatic tissue during experimental pancreatitis. Modification of lung proteins by 4-hydroxynonenal. *Digestive Diseases and Sciences* 2001; 46:932-937
- **Gloor B**, Blimman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, et al. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2000; 21: 414-420
- **Gordon S**. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35
- **Gordon S, Taylor PR**. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 953-964.
- **Gordon S**. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol.* 2007; 37 Suppl 1:S9-17

- **Varin A**, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009; 214: 630-641.
- **Granell S.**, Pereda J., Casinello N., Gomez-Cambronero LG, Sabater L., Closa D., Sastre JN. Circulating TNF α and their soluble receptors Turing experimental acute pancreatitis. *Cytokine* 2003;25:187-191
- **Granell S**, Serrano-Mollar A, Folch-Puy E, Navajas D, Farre R, Bulbena O and Closa D. Oxygen in the alveolar air space mediates lung inflammation in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2004c; 37: 1640-1647.
- **Greagh EM**, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006; 27:352-357
- **Gukovskaya AS**, et al. Pancreatic acinar cells produce, release and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 1853-1862
- **Gutierrez PT**, Folch-Puy E, Bulbena O, Closa D. Oxidized lipids present in ascitic fluid interferes the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response. *Gut* 2008; 57:642-648
- **Hamilton TA**, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res* 2002; 25:229-245.
- **Hebenstreit D**, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:173-188.
- **Hashimoto K**, Ethridge RT, Saito H, Rajaraman S, Evers BM. The PPARgamma ligand, 15d-PGJ2, attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: 58-66
- **Hershey GK**. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 677-690.
- **Hietaranta A**, Kempainen E, Puolakkainen P, Sainio V, Haapiainen R, Peuravuori H, et al. Extracellular phospholipase A2 in relation to SIRS and systemic complications in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1999; 18: 385-391.
- **Hilgers W.** i Kern S.E. Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes. Cancer* 1999; 26: 1-12

- **Hirota M.**, Nozawa F., Okabe A., Shibata M., Beppu T, Shimada S., Egami H., Yamaguchi Y., Ikei S., Okajima T., Okamoto K., Ogawa M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000; 21: 141-146
- **Hume DA**, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol*. 2002; 72: 621-627.
- **Hume DA**. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*. 2006 ; 18: 49-53.
- **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
- **Isenmann R**, Rau B, Beger HG. Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg*. 1999; 86: 1020-1024
- **Janero DR**. *Free Radical Biology & Medicine* 1990; 9: 515-540
- **Jiang C**, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86.
- **Katakura T**, Miyazaki M, Kobayashi M Herndon DN, Suzuki F. CCL17 and IL10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J Immunol* 2004;172:1407-1413
- **Kingsnorth A**. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 1997;40:1.
- **Klar E**, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C. Pancreatic ischemia in experimental acute pancreatitis: Mechanism, significance, and therapy. *Br J Surg* 1990;77:1205.
- **Kliwer SA**, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4318-4323
- **Kloppel, G.** and B. Maillet. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1993; 8: 659-670.

- **Krutzik SR**, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005; 11: 653-660.
- **Kuhlmann H**. The magic potions in the belly gland. 1ª ed. *Rudmann MA*. Hannover (1999)
- **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
- **Lankisch PG**, Pflithofer D, Lehnick D. No strict correlation between necrosis and organ failure in acute pancreatitis. *Pancreas.* 2000;20:319-322
- **Lu R**, Pitha PM. Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7. *J Biol Chem.* 2001;276:45491-45496.
- **Makhija R**, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002;9:401-410.
- **Malur A**, Mccoy AJ, Arce S, et al. Deletion of PPAR γ in alveolar macrophages is associated with a Th-1 pulmonary inflammatory response. *J Immunol* 2009; 182:5816-5822
- **Mantovani A**, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23:549-555.
- **Mantovani A**, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25:677-686
- **Mantovani A**, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 2005 ;23:344-346.
- **Martinez J**, Sánchez-Payá J, Palazón JM, Aparicio JR, Picó A, Pérez-Mateo M. Obesity: a pronostic factor of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* 1999; 19:15-20
- **Martinez FO**, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol* 2006;177:7303-7311.

- **Martinez FO**, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13:453-461
- **Masamune A.**, Shimosegawa T., Kimura K., et al. Specific induction of adhesion molecules in human vascular endothelial cells by rat experimental pancreatitis-associated ascitic fluids. *Pancreas* 1999; 18:141-150
- **McKay CJ**, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW and Baxter JN. Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996;83: 919-923.
- **Metchnikoff E.** Lectures in the Comparative Pathology of Inflammation. London: 1893
- **Merad M**, Sugie T, Engleman EG, Fong L. In vivo manipulation of dendritic cells to induce therapeutic immunity. *Blood*. 2002 ;99:1676-1682.
- **Montaner LJ**, da Silva RP, Sun J, Sutterwala S, Hollinshead M, Vaux D et al. Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1999; 162:4606-4613.
- **Molero X.**,Guarner F, Salas A.,Mourelle M, Puig V, Malagelada JR. Nitric oxide modulates pancreatic basal secretion and response to cerulein in the rat: effects in acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1995;108:1855-1862.
- **Morgenroth K.**, Kozuschek W. Pancreatitis. 1ª ed. *Walter de Gruyter*. Berlín (1991)
- **Moshage H**, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation *Clin.Chem*. 1995; 41:892-896.
- **Mosser DM.** The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73:209-212
- **Mosser DM**, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:958-969
- **Moynihan B.** Acute pancreatitis. *Annals of Surgery* 1925;81.
- **Murr MM**, Yang J, Fier A, Foulis PR, Loughorn TP Jr, Epling-Burnette PK, Norman JG. Pancreatitis-associated ascitic fluid induces hepatocyte death independent of local cytokines. *J Surg Res*. 2002 ;106:308-313.
- **Navarro S.**, Pérez-Mateo M., Guarner L. Tratado de páncreas exocrino. 1ªed. *J&C Ediciones Médicas, S.L.* Barcelona (2002)

- **Nakajima T**, Ueda T, Takeyama Y, Yasura T, Shinzaki M, Sawa H, Kuroda Y. Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2007;34:410-416.
- **Nencioni A**, Wesselborg S, Brossart P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses. *Crit Rev Immunol* 2003; 23:1-13
- **Neoptolemos, J. P.**, M. Raraty, M. Finch and R. Sutton. Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. *Gut* 1998; 42: 886-891.
- **Niederau C.**, Crass RA., Silver G., et al Therapeutic regimens in acute experimental hemorrhagic pancreatitis. Effects of hydration, oxygenation, peritoneal lavage and a potent protease inhibitor. *Gastroenterology* 1988;95:1648-1657.
- **Niederau C**, Frohnhoffs C, Klonowski H, Shulz HU. Active pancreatic digestive enzymes show striking differences in their potential to damage isolated pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Invest* 1995;125:265-275.
- **Norman, JG.**, Fink GW and Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* 1995a; 130: 966-970.
- **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
- **Norman J**. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998;175:76-83.
- **Odegaard JI**, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007; 447: 1116-1120.
- **Ogawa M**. Acute pancreatitis and cytokines: "Second Attack" by septic complication leads to organ failure. *Pancreas* 1998; 16: 312-315.
- **Okuno M**, Arimoto E, Ikenobu Y, Nishihara T, Imagawa M. Dual DNA-binding specificity of peroxisome-proliferator-activated receptor γ controlled by heterodimer formation with retinoid X receptor α . *Biochem J* 2001; 353: 193-198.

- **Pappas TN**, Gavino VC, Ellison EC, i cols Concentration of FFA in pancreatitis-associated ascitic fluid. *Clin Chem* 1981;27:358
- **Pastor CM**, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124:2341-2351
- **Pérez A**, Whang EE, Brooks DC, Moore FD, Hughes MD, Sica GT et al. Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extend necrosis and infected necrosis?. *Pancreas*. 2002;25:229-33
- **Pezzilli R.**, Fantini L., Morselli-Labate AM. New approaches for the treatment of acute pancreatitis. *Journal of Pancreas*. 2006; 7: 79-91
- **Platell C.**, Cooper D., Hall JC. A meta-analysis of peritoneal lavage for acute pancreatitis. *J Gastroenterol. Hepatol* 2001;16:689-693
- **Prinz, RA.** Mechanisms of acute idiopathic pancreatitis: vascular etiology. *Int J Pancreatol* 1991;9:31.
- **Rajala MW**, Scherer PE. Minireview. The adipocyte: at the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144:3765-3773
- **Raes G**, Van den BR, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M et al. Arginase1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* 2005;174:6561-6562.
- **Ramudo L.**, Manso M.A., De Dios I. Biliary pancreatitis-associated ascitic fluid activates the production of tumour necrosis factor-alpha in acinar cells. *Crit. Care Med*. 2005; 33:143-148
- **Ramudo L**, Manso MA, Vicente S, De Dios I. Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine*. 2005; 32:125-131
- **Ricote M**, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391:79-82.
- **Rizzo G**, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in I nflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:421-427
- **Sasmono RT**, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, Ostrowski MC, Himes SR, Hume DA. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout

- the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood*. 2003;101:1155-1163
- **Schaer DJ**, Boretti FS, Schoedon G, Schaffner A. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol* 2002;119:239-243.
 - **Sakorafas GH**, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30: 343-56.
 - **Savill J**, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:965-975.
 - **Sato A**, Shimosegawa T, Masamune A, Fujita M, Koi M, Toyota T. Ascitic fluid of experimental severe acute pancreatitis modulates the function of peritoneal macrophages. *Pancreas* 1999; 19: 268-275.
 - **Serbina NV**, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-452
 - **Sebring RJ**, Lehnert BE. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Exp. Lung Res*. 1992; 18:479-496
 - **Serrano-Mollar A**, Nacher M, Gay-Jordi G, et al. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1261-1268
 - **Sevensson C**, Sjö Dahl R, Tagesson C, Ihse I. Increased peritoneal permeability in acute experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1989; 4: 83-90.
 - **Steer, M. L.** Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128:13-16.
 - **Stein M**, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992; 176:287-292.
 - **Sweiry JH**, Mann GE. Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31-10.
 - **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

- **Testoni PA.** Pharmacological Prevention of Post-ERCP Pancreatitis: The Facts and the fiction. *Journal of Pancreas*.2004 5:171-178
- **Thompson PW,** Bayliffe AI, Warren AP, et al. Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4⁺ T cells. *Cytokine* 2007; 39:184-191
- **Trush MA,** Egner PA, Kensler TW. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food Chem Toxic* 1994;32:143-147.
- **Tsukahara Y,** Morisaki T, Horita Y, Torisu M, Tanaka M. Phospholipase A2 mediates nitric oxide production by alveolar macrophages and acute lung injury in pancreatitis. *Ann Surg* 1999;229:385-92.
- **Turpin JA,** López-Berestein G. Differentiation, maturation and activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by a continuum of maturation. 1993; 71-99
- **Uchimura K,** Nakamura M, Enjoji M, Irie T, Sugimoto R, Muta T, Iwamoto H, Nawata H. Activation of retinoic x receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-γ inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-α production in rat kupffer cells. *Hepatology* 2001; 33: 91-99.
- **Uehara S,** Honjyo K, Furukawa S, Hirayama A. Sakamoto W. Role of the kallikrein-kinin system in human pancreatitis. *Adv Exp Med Biol* 1989; 247B:643-8.
- **Uhl, W.** Et al. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology*. 2002; 2, 565-573
- **Valenzuela JE,** Ribet A. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. In: Valenzuela JE, Reber HA, Ribet A, editors. *Medical and surgical diseases of the pancreas*. New York: Igaku-Shoin Ltd, 1991; p.29-45.
- **Van Acker GJ,** Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song Am, Steer ML. Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283:G794-G800
- **Vega MA,** Corbí AL. Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type. *Inmunologia*. 2006; 24:248-272
- **Virlos I. et al.** Pyrrolidine dithiocarbamate reduces the severity of cerulein-induced murine acute pancreatitis. *Shock* 2003; 20: 544-550

- **Wang Y**, Wang YP, Zheng G et al Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int* 2007;72:290-299.
- **Werner J**, Dragotakes SC, Fernández-del Castillo C, Rivera JA, Ou J, Rattner DW, et al. Technetium-99m-labeled white blood cells. A new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 1998; 227: 86-94.
- **Werner J**, Uhl W, Hartwig W, Hackert T, Muller C, Strobel O, Buchler MW. Modern phase-specific management of acute pancreatitis. *Dig Dis* 2003;21:38-45
- **Willemer S**, C. O. Feddersen, W. Karges and G. Adler. Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. I. Morphological studies. *Int J Pancreatol* 1991; 8: 305-321.
- **Zhang C**, Ge CL, Guo RX, He SG. Effect of IL4 on altered expression of complement activation regulators in rat pancreatic cells during severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:6770-6774
- **Zang XP**, Wang L, Zhou YF. The pathogenic mechanism of severe acute pancreatitis complicated with renal injury: a review of current Knowledge. *Dig. Dis. Sci.*,2008;52:297-306
- **Zyromsky N**, Murr MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery* 2003; 133:235-237