

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PAPEL DE HMGB1 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTEMICA EN PACIENTES CON PANCREATITIS AGUDA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A**

**MAURICIO ROSAS BALLINA**

m. 352169

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO SISIBASI ARAUJO

MÉXICO, D.F

SEPTIEMBRE 2005





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mauricio Rosas Ballina

FECHA: 3 Nov 05

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Rosas Ballina Mauricio** con número de cuenta **94517466** con la tesis titulada: **"Papel de HMGB1 en la Respuesta Inflamatoria Sistemática en Pacientes con Pancreatitis Aguda"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Armando Isibasi Araujo**.

Presidente:	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Vocal:	Dra. Gladys Fragoso González
Secretario:	Dr. Armando Isibasi Araujo
Suplente:	Dr. David Kershenobich Stalinikowitz
Suplente:	Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 19 de septiembre del 2005

[Firma]  
Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El autor de esta tesis fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE) de la UNAM.

Comité Tutorial:

Dr. Armando Isibasi Araujo.  
Dra. Gladis Fragoso Gonzalez  
Dr. Edgar Zenteno Galindo

## **Agradecimientos**

A Hiroshi y Marie-Thérèse por su cariño y amistad; por su apoyo en lo académico y en lo personal pero sobre todo por su guía: Sin camino no hay esperanza y gracias a ustedes tengo uno. Ya no los atormentaré con más de mi aporreo.

A mis padres. Llevo mucho de lo bueno de ustedes en mí y gran parte de este trabajo es producto de todo eso.

A mis hermanos. Me siguen sirviendo de ejemplo.

Al viejo Rob y Danny, por sus animadas pláticas y noches interminables jugando PS.

A Nanilla por dejarse querer a mi manera. Gracias por tu cariño y jaladas de oreja merecidas.

A mis compañeros de laboratorio. Maricarmen, por ser ejemplo de profesionalismo y calidez en el trabajo. A Tinoman, por tus arengas y apoyo logístico. A Rosilla y L'Eli por su esfuerzo enorme por escucharme y entenderme.

A mis compañeros de equipo, Adicerezopuntocom y Anti-buddy, por su comprensión y ayuda invaluable en la elaboración de este trabajo. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A Pepe Moreno, Gibrán Flakes, Arturo Cébulo, Alexandretta y a todos aquellos que facilitaron instalaciones y equipo, enseñanzas y consejos técnicos.

A mi tío Paco quien hizo posible los viajes para establecer contactos y abrir caminos.

A Bayabán por hacer más llevadero mi exilio.

A Kevin Tracey y a la gente del laboratorio de Ciencias Biomédicas del NS-LIJ Research Institute por facilitar recursos y espacio para la cuantificación de HMGB1.

*A Emilio, a Aitana y a los que vienen.*

## RESUMEN

La inflamación es un proceso en el que intervienen células y moléculas del sistema inmune innato como respuesta a una infección local o lesión celular. A pesar de la existencia de mecanismos reguladores, el proceso inflamatorio inicial puede superar este control y convertirse en un evento sistémico conocido clínicamente como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). El SIRS incluye enfermedades con diversas etiologías como sepsis, choque hemorrágico y pancreatitis. En oposición a la respuesta proinflamatoria sistémica puede aparecer una respuesta antiinflamatoria compensadora (CARS) que se manifiesta clínicamente como inmunodepresión y propensión a infecciones secundarias. La pancreatitis aguda se presenta como un proceso inflamatorio sistémico y es considerada como un modelo para el estudio de SIRS. Recientemente, la proteína nuclear HMGB1 ha sido caracterizada como un mediador tardío de letalidad en sepsis. El carácter proinflamatorio de esta citocina y su cinética tardía pudieran ser críticas para restablecer el perfil proinflamatorio en pacientes en CARS.

Con el fin de comprender el papel de HMGB1 en la respuesta inflamatoria sistémica se estudiaron 23 pacientes con pancreatitis aguda. Se obtuvo plasma cada 12 horas durante los primeros cuatro días de estancia hospitalaria. Se determinó la concentración de proteína C reactiva, INF- $\gamma$  y HMGB1 como marcadores proinflamatorios y la expresión de HLA-DR en la superficie de monocitos e IL-10 como marcadores de CARS. También se determinó la expresión de TLR1, TLR2 y TLR4 en la superficie de monocitos.

Los pacientes con pancreatitis aguda presentaron una respuesta tanto proinflamatoria (medida en términos de PCR y INF- $\gamma$ ) como antiinflamatoria (HLA-DR e IL-10). Todos los casos de pancreatitis severa presentaron disminución de HLA-DR en la superficie de monocitos. Tres pacientes con pancreatitis severa presentaron CARS (expresión de HLA-DR menor a 30% en algún momento del estudio) y dos de ellos desarrollaron sepsis. La expresión de TLR1, TLR2 y TLR4 en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda no presentó un patrón de comportamiento específico. HMGB1 se encontró elevada en pacientes con pancreatitis aguda aunque sin significancia estadística. La presencia temprana de HMGB1 podría ser explicada por la necrosis pancreática asociada al inicio de la pancreatitis.

## ABSTRACT

Inflammation is the innate immune system's response to local infection or cell damage. To avoid an excessive deleterious response, inflammation is kept in check by several regulatory mechanisms. Despite these mechanisms, the initial inflammatory process can become a systemic event known as the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). The SIRS comprises several distinct pathological entities with different etiologies such as sepsis, hemorrhagic shock, and pancreatitis. In some patients, and opposed to the systemic pro-inflammatory response, a compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) may arise. The CARS is characterized by immunodepression and propensity to secondary infections. Acute pancreatitis is characterized by a systemic inflammatory process and is considered as a model to study SIRS. Recently, the nuclear protein HMGB1 has been characterized as a late mediator of lethality in sepsis. The pro-inflammatory character of this cytokine and its late kinetics could help reestablish the pro-inflammatory profile in CARS patients.

In order to understand the role of HMGB1 in the systemic inflammatory response, we studied 23 acute pancreatitis patients. Plasma was obtained every 12 hours during the first four days. As markers of SIRS we measured the serum concentration of C reactive protein, INF- $\gamma$  and HMGB1. HLA-DR surface expression on monocytes and IL-10 were also determined and were considered as indicators of CARS. TLR1, TLR2, TLR4 surface expression on monocytes was also determined.

In terms of C reactive protein and INF- $\gamma$  serum concentrations, acute pancreatitis patients presented with a pro-inflammatory response as well as an anti-inflammatory response (decreased HLA-DR expression and increased IL-10). All severe acute pancreatitis cases showed decreased HLA-DR expression on monocytes. CARS was identified in three cases (less than 30% of monocytes expressing HLA-DR at a given time during the study) and two of them developed sepsis. TLR1, TLR2 or TLR4 did not show a specific expression pattern. HMGB1 was found increased in patients with acute pancreatitis as compared to healthy volunteers albeit non-significantly. The necrotic process associated to the initial stages of acute pancreatitis could explain the early detection of HMGB1.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CARS	Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora (compensatory anti-inflammatory response syndrome)
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HMGB1	Proteína del grupo alta movilidad (high mobility group protein-1)
IL-1	Interleucina 1
IL-1ra	Receptor antagonista de IL-1
LPS	Lipopolisacárido
MARS	Síndrome de respuesta de antagonistas mixtos (mixed antagonist response syndrome)
PAI	Inhibidor del activador de plasminógeno (plasminogen activator inhibitor)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PRR	Receptores que reconoce patrones (pattern recognition receptors)
RAGE	Receptor de los productos avanzados de glucosilación (receptor for advanced glycated end-products)
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (systemic inflammatory response syndrome)
sIL-1R	Receptor soluble de IL-1
sTNFR	Receptor soluble de TNF
TLR	Receptores tipo Toll (Toll-like receptors)
TNF	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador tisular de plasminógeno (tissue plasminogen activator)

# **PAPEL DE HMGB1 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA EN PACIENTES CON PANCREATITIS AGUDA ANTECEDENTES**

## **INFLAMACIÓN**

El sistema inmune se divide en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato es el primero en reconocer antígenos no propios, no tiene memoria e influye sobre la manera en que el sistema inmune adaptativo actúa[1]. Este último se activa de manera tardía, tiene memoria y es específico[2;3]. La inflamación es un proceso en el que intervienen células y moléculas del sistema inmune innato como respuesta a una infección o lesión celular. Esta respuesta limita el daño provocado por el agente causal y promueve la reparación del tejido afectado. En ocasiones, sin embargo, la inflamación no es regulada adecuadamente y ocasiona enfermedades.

El sistema inmune innato es el responsable de iniciar el proceso inflamatorio[4]. Ante un agente patógeno o daño celular, el endotelio expresa moléculas de adhesión reclutando diversos tipos de leucocitos al sitio del evento original. La expresión sucesiva de moléculas de adhesión y de quimiocinas permite el fenómeno de marginación, rodamiento y migración[5]. La activación de las células efectoras (monocitos y fagocitos polimorfonucleares) ocasiona la formación de intermediarios reactivos de oxígeno, óxido nítrico, defensinas y acidificación de fagosomas. En conjunto, estos mecanismos aumentan la actividad fagocítica, promueven el reclutamiento de más células efectoras y mediante la presentación de antígenos, inician la respuesta adaptativa[6].

Las células del sistema inmune innato detectan la presencia de agentes extraños a través de receptores tipo Toll (Toll-like receptor, TLR) y, como consecuencia, inician y regulan la respuesta inmune adaptativa [1;7;8]. Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) de manera "específica" o diferencial[9] y forman parte del grupo de receptores que reconocen patrones (pattern recognition receptors, PRRs)[10]. De esta manera, TLR4 reconoce y transduce la señal del lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de bacterias gram-negativas[8]; TLR1 reconoce lipopéptidos triacilados, TLR3 reconoce RNA de doble cadena, TLR5 reconoce flagelina[11], TLR9 reconoce CpG[12], por ejemplo.

Durante el proceso inflamatorio, una respuesta antiinflamatoria limita la magnitud de la respuesta proinflamatoria inicial y el daño colateral asociado[13;14]. Por causas aún no comprendidas, el proceso inflamatorio local puede convertirse en un evento sistémico. Esta condición clínica recibe el nombre de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)[15;16].

### **SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA**

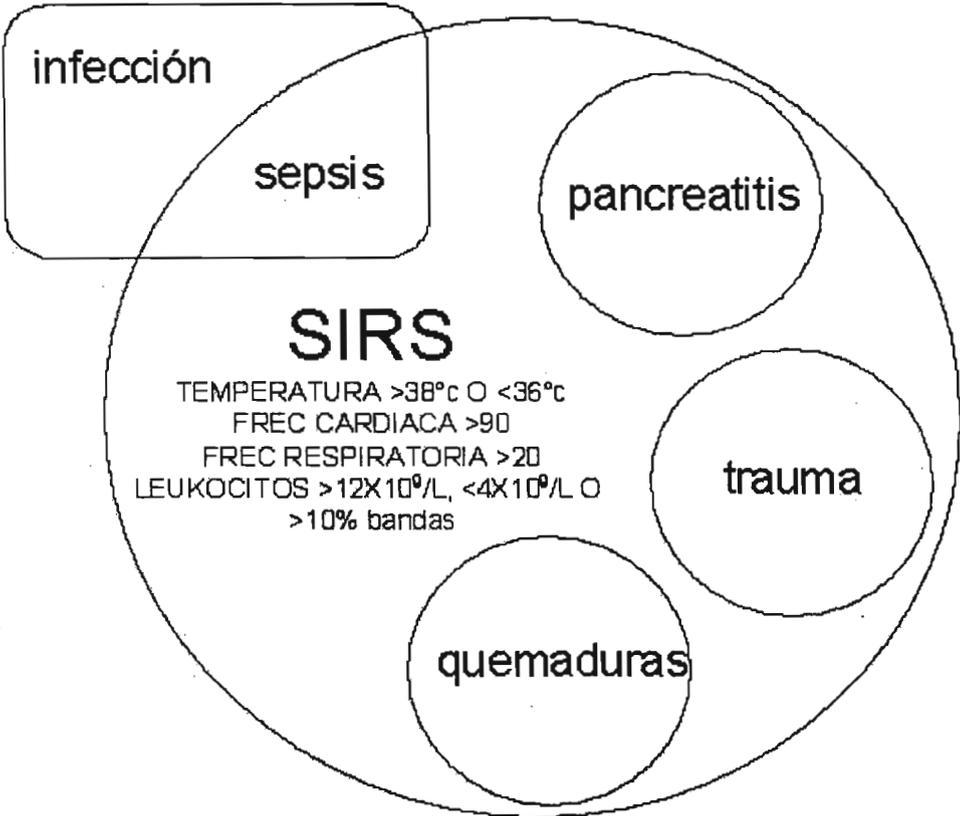
La infección, la pancreatitis, el trauma severo y las quemaduras son enfermedades que pueden dar origen a este síndrome. Se diagnostica SIRS en un paciente que manifiesta al menos dos de los siguientes criterios clínicos: temperatura mayor de 38°C o menor de 36°C; frecuencia cardíaca mayor de 90 por minuto; frecuencia respiratoria mayor de 20 por minuto o PaCO<sub>2</sub> menor de 4.3 kPa; más de 12,000 leucocitos por mm<sup>3</sup>, menos de 4,000/mm<sup>3</sup> o más de 10% de formas inmaduras[17]. La respuesta de citocinas y las manifestaciones clínicas que éstas generan son comunes a todas las causas de SIRS. Por lo tanto, una vez que enfermedades tan diferentes como la pancreatitis y el trauma severo generan una respuesta inflamatoria sistémica, ambas presentan un comportamiento molecular y clínico homólogos [18;19](figura 1).

Desde un punto de vista epidemiológico, la sepsis es la causa de SIRS que tiene más relevancia ya que ocasiona el mayor número de muertes en los pacientes que se encuentran en estado crítico[20]. En 1995 en los Estados Unidos, se estimó la existencia de 750,000 nuevos casos al año, de los cuales 210,000 (28%) fueron defunciones. El costo promedio de la atención a estos pacientes es de 22,000 dólares con un costo total anual de 16 mil millones de dólares[21].

### Sepsis

El evento inicial en los pacientes con sepsis es la liberación de una endotoxina o una sustancia comparable (PAMP). Una vez en la circulación, este PAMP es reconocido por su PRR correspondiente en macrófagos y células endoteliales. El paradigma utilizado para estudiar la vía de señalización de PAMPs a través de PRRs es el reconocimiento

Figura 1. Relación entre pancreatitis, sepsis y otras causas de SIRS



Modificado de Wilson PG, J Antimicrob Chemother 1998

del LPS de bacterias gram-negativas a través del complejo CD14/MD2/TLR4 en el macrófago y su posterior activación[8]. Esta vía incluye la activación sucesiva de MyD88, IRAK, TRAF-6, MAP cinasas y NF-kappaB[22]. La translocación de NF-kappaB al núcleo genera la transcripción de moléculas de adhesión, citocinas (TNF, IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-10, G-CSF), proteínas de fase aguda, factores de transcripción, óxido nítrico sintasa y cicloxigenasa-2, entre otros[23].

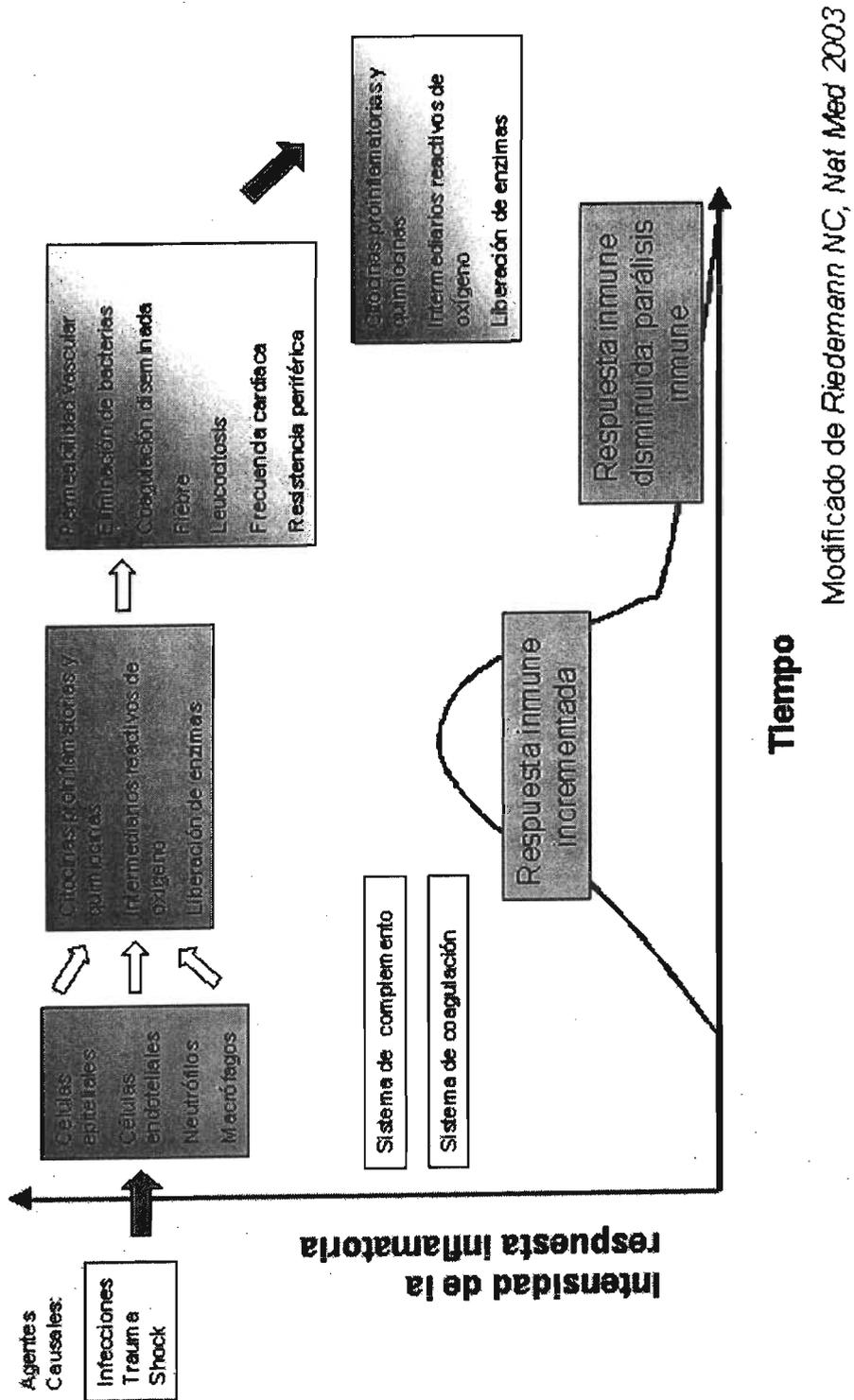
Una vez en la circulación, estas citocinas, en especial TNF, IL-1 e IL-6, perpetúan la cascada de citocinas proinflamatorias a través de la activación de células endoteliales. Esta secuencia de eventos tiene como consecuencia la generación de un estado procoagulante caracterizado por activación de trombina, inhibición de la cascada de anticoagulación y fibrinólisis disminuida[5]. Además de ser responsable de la coagulación en la microcirculación, la disfunción endotelial causa adhesión y migración de leucocitos, activación de especies reactivas de oxígeno, vasodilatación y producción de citocinas[24].

El sistema de complemento también es activado a través de LPS (vía alterna) o a través de la unión de manosa con su receptor (vía de la lectina). Ambas vías coinciden en C3 y llevan a la producción de C3a, C5a y el complejo C5b-9. C5a es un factor quimiotáctico potente, induce la producción de anión superóxido en neutrófilos, vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular y liberación de enzimas granulares y producción de ROS por macrófagos[25]. Todo esto en conjunto puede originar una respuesta proinflamatoria excesiva que resulta en daño tisular y falla orgánica múltiple[26;27].

En respuesta a la cascada de citocinas proinflamatorias, se producen mediadores antiinflamatorios como IL-4, IL-10, IL-13 y PGE<sub>2</sub> que suprimen la síntesis y acción de los mediadores inflamatorios. Además, receptores solubles como IL-1ra, sIL-1RII, sTNFRp75, sTNFRp55, tienen efectos antiinflamatorios al antagonizar o neutralizar la acción de su ligando correspondiente[28].

Clínicamente, esta secuencia de eventos celulares y moleculares, lleva a la falla circulatoria, lesión tisular inducida por leucocitos y coagulación sistémica que son los determinantes críticos en el desarrollo de la falla orgánica múltiple[28](figura 2).

Figura 2. Curso de la respuesta inflamatoria en sepsis



Modificado de Riedemann NC, Nat Med 2003

## TRATAMIENTOS CONTRA SEPSIS Y POR QUÉ NO HAN FUNCIONADO

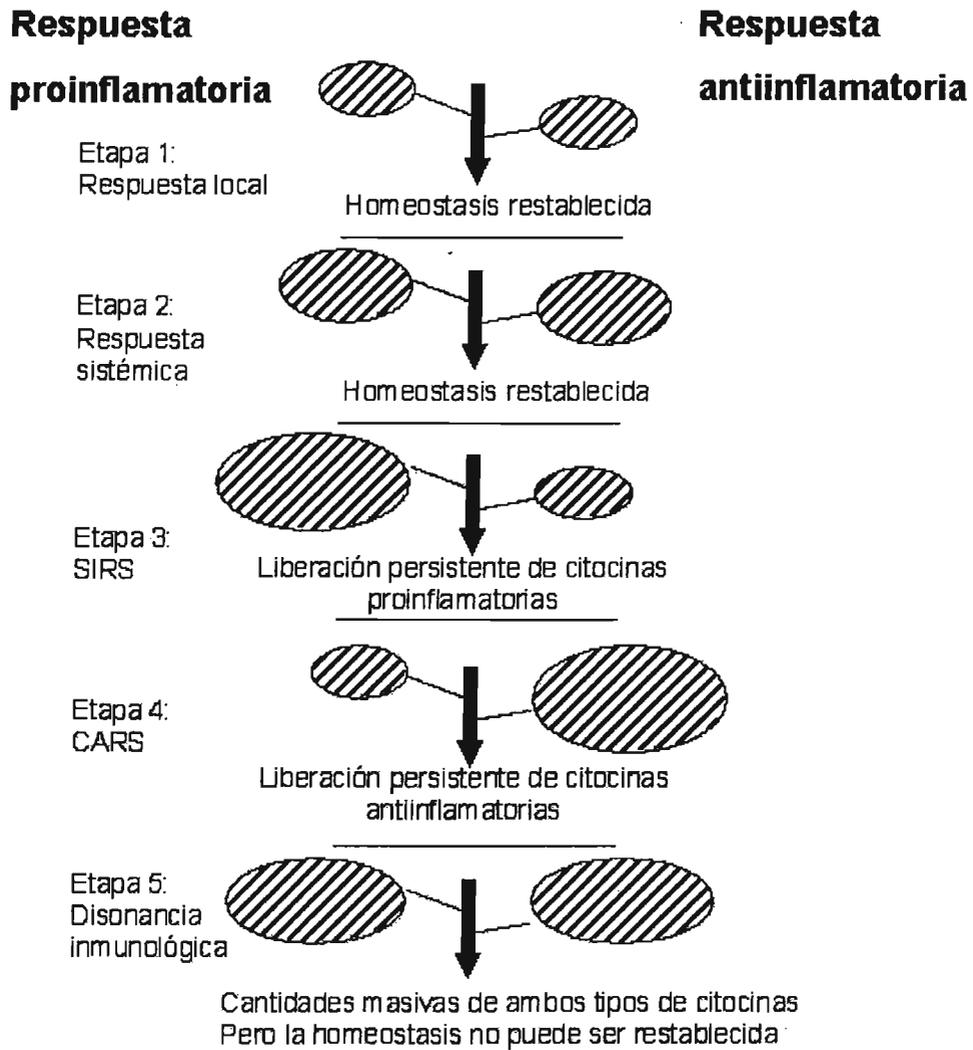
Algunas de las moléculas que han servido como blanco terapéutico en el tratamiento de la sepsis son LPS, TNF, IL-1 $\beta$ , óxido nítrico y moléculas del sistema de complemento. Salvo la administración de proteína C reactiva, el resto de los fármacos no han sido aprobados para su uso en humanos[29]. El objetivo de estas monoterapias ha sido bloquear o eliminar el agente proinflamatorio y modular la cascada de citocinas subsecuente. El fracaso de estos tratamientos se debe, en parte, al concepto erróneo de que existe un sólo mediador crítico, en gran parte responsable de la fisiopatología de la sepsis[15;30].

Otro factor que ha influido para que los tratamientos propuestos para la sepsis no hayan tenido el éxito deseado es la diferencia en la cinética de citocinas entre especies, lo que dificulta extrapolar al humano los resultados obtenidos en animales[31]. Además, los experimentos se han realizado en animales sanos y en periodos de observación cortos. Los pocos ensayos con humanos se han llevado a cabo con dosis no letales de endotoxina y el seguimiento de la evolución ha sido breve, mientras que la sepsis y la falla orgánica múltiple se desarrollan a lo largo de periodos más prolongados[32]. Por último, la dificultad para definir el estado inmune de los pacientes ha impedido clasificarlos adecuadamente entre aquéllos que presentan un estado proinflamatorio de los que se encuentran más bien en un estado de "parálisis inmune"[26;27].

La inconsistencia en los resultados obtenidos con los tratamientos disponibles contra la sepsis originó que la fisiopatología de la respuesta inflamatoria sistémica fuera revisada. En 1996, Bone[15] acuñó el término de "síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora" (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) para definir lo que en estos pacientes se manifiesta clínicamente como susceptibilidad a la infección y en el nivel celular como anergia de los monocitos. Bone propuso un modelo de cinco etapas sucesivas para explicar el desarrollo de la respuesta inflamatoria: Una respuesta local, el escape de mediadores a la circulación sistémica, SIRS, CARS y disonancia inmunológica[15;31] (figura 3).

En la primera fase, una lesión local de origen infeccioso o herida quirúrgica, por ejemplo, genera una reacción inflamatoria que limita y repara el daño tisular. A ésta le

Figura 3. Las cinco etapas en el desarrollo de la falla orgánica múltiple



Modificado de *Bane RC, Ann Intern Med 1996*

sigue una reacción antiinflamatoria local que evita que la reacción inflamatoria aumente en magnitud y genere más daño. La respuesta se convierte en sistémica cuando el daño inicial es severo y sobrepasa la capacidad reguladora de la respuesta antiinflamatoria. En esta etapa se pueden detectar citocinas y otros mediadores proinflamatorios en la circulación. Finalmente, aparece una respuesta sistémica antiinflamatoria donde muy pocos signos clínicos son evidentes.

#### Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora

En algunos pacientes la regulación de la respuesta inflamatoria es inadecuada y es evidente una reacción sistémica masiva que se manifiesta como SIRS. A menos que la homeostasis sea recuperada, sobreviene falla orgánica múltiple y muerte. Algunos pacientes fallecen en esta fase mientras que otros desarrollan una fase antiinflamatoria que puede ser excesiva y ocasionar inmunosupresión[15;31].

La característica cardinal del CARS es la "parálisis inmune"[33]. Ésta se caracteriza por la disminución de la capacidad del monocito para secretar TNF *ex vivo* ante el estímulo con LPS. Además, es una condición que se asocia a la disminución en la expresión de HLA-DR y CD80/86 en la superficie del monocito, y por tanto, a la incapacidad para presentar antígenos. Esta alteración se presenta en pacientes posquirúrgicos, pacientes con traumatismo severo, quemaduras o sepsis[34;35] y se relaciona con infecciones oportunistas y mal pronóstico[36-38]. Tanto la expresión de HLA-DR como la disminución en la síntesis de TNF- $\alpha$  ante el estímulo con LPS *ex vivo* son considerados como indicadores moleculares de CARS[36;39].

#### Síndrome de respuesta mixta de antagonistas

La fase final es la de "disonancia inmunológica". En ésta, se puede presentar inflamación masiva persistente o inmunosupresión complicada con infecciones secundarias. Algunos pacientes oscilan entre periodos de inflamación e inmunosupresión hasta que sobreviene la muerte. Este estado es conocido como síndrome de respuesta de antagonistas mixtos (mixed antagonist response syndrome, MARS)[16].

De acuerdo con el tipo de evidencia clínica manifestada, se sugiere la prevalencia de un síndrome sobre otro o la coexistencia de ambos: Compromiso cardiovascular (predomina SIRS); homeostasis (balance entre SIRS Y CARS); apoptosis

(predomina SIRS); disfunción orgánica (predomina SIRS); inmunosupresión (predomina CARS) [16;31].

### **PANCREATITIS AGUDA COMO MODELO DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA**

La pancreatitis aguda es un proceso inflamatorio agudo del páncreas y tejidos situados alrededor de éste, que puede propagarse y afectar órganos remotos [40;41]. Las causas de la pancreatitis aguda son diversas aunque los cálculos en el conducto biliar común (80% de los casos) y el consumo agudo de alcohol son las más frecuentes [42;43]. La característica clínica de la pancreatitis aguda es el dolor epigástrico continuo, penetrante y con irradiación a la espalda. La pancreatitis aguda se clasifica en leve o severa de acuerdo a los criterios de Ranson [44] y puede presentar complicaciones como el choque circulatorio, falla renal e insuficiencia respiratoria [43;44].

La pancreatitis aguda es considerada como un modelo para el estudio del SIRS ya que presenta una cascada de mediadores moleculares homóloga a la encontrada en sepsis y otras causas de inflamación sistémica [45]. Sin embargo, a pesar de que la pancreatitis aguda y la sepsis presentan una patrón de citocinas comparable [46], el estudio de pacientes con pancreatitis ofrece ciertas ventajas con respecto al estudio los pacientes sépticos.

En primer lugar, el dolor abdominal en los pacientes con pancreatitis se considera como un signo del inicio del proceso inflamatorio mientras que en los pacientes sépticos tal indicador no existe [32;41]. Se estima, además, que los pacientes con pancreatitis ingresan al hospital 36 a 72 horas después del evento molecular que genera el padecimiento. En cambio, los pacientes que desarrollan sepsis lo hacen días o semanas después de iniciada la infección. Esto ocasiona que los pacientes sépticos de una cohorte se encuentren en diferentes fases en la evolución del proceso inflamatorio lo que dificulta la interpretación de resultados. Por último, los pacientes con pancreatitis tienen un comportamiento clínico más homogéneo que los pacientes sépticos [46].

### **MEDIADORES DE INFLAMACIÓN EN PANCREATITIS**

Los estudios de citocinas en pancreatitis se han limitado a establecer marcadores de severidad (IL-6 e IL-8) o mediadores de progresión de la enfermedad (TNF e IL-1) [47;48]. Sin embargo, son pocos los estudios que tienen como fin

caracterizar la respuesta inmune temprana en este tipo de pacientes [49]. Uno de estos trabajos ha concluido que la activación intrapancreática de enzimas digestivas ocasiona una lesión tisular local. Como consecuencia, los macrófagos que residen en el páncreas liberan IL-1, TNF, IL-6, e IL-10[50]. Aparte del macrófago, las células acinares del páncreas son otra fuente de mediadores inflamatorios (bradicininas, óxido nítrico y quimiocinas)[18]. La producción de citocinas en el páncreas es seguida, horas después, por una producción adicional en órganos como el hígado, pulmón y bazo. El factor o grupo de factores que inducen la expresión de citocinas en estos sitios aún se desconoce[51]

### **HMGB1**

La proteína nuclear HMGB1 ha sido considerada recientemente como un blanco terapéutico en sepsis[52-54]. HMGB1 (high mobility group protein-1) es un miembro del grupo de las proteínas de gran movilidad, llamadas de esta manera por su movilidad electroforética. La proteína HMGB1 de humano cuenta con 219 residuos en su secuencia primaria. Su extremo amino es rico en residuos de lisina, mientras que en el extremo carboxilo aparecen 30 residuos consecutivos de ácido aspártico o ácido glutámico[55]. HMGB1 y otros miembros de la familia, comparten el motivo conocido como "caja" HMG, un fragmento de aproximadamente 80 residuos, en forma de "L" que otorga a la proteína su capacidad de unión al DNA y el reconocimiento de estructuras distorsionadas de DNA[56] tales como el DNA cruciforme y residuos de cisplatino-DNA[57].

HMGB1 es un mediador tardío en la letalidad por sepsis[58]: HMGB1 es secretada por monocitos estimulados por más de 8 horas con LPS, TNF e IL-1. Además, HMGB1 es detectada 8 a 32 horas después de la inyección de endotoxina en ratones. En éstos, la administración tardía de anticuerpos anti-HMGB1 atenúa la letalidad por endotoxina. Finalmente, la administración de HMGB1 en ratones es letal. En humanos, se ha encontrado HMGB1 elevada en el suero de pacientes sépticos y en un caso de choque hemorrágico.

La administración intratraqueal de HMGB1 produce lesión inflamatoria aguda del pulmón con acumulación de neutrófilos, edema pulmonar y aumento en la producción pulmonar de TNF e IL-1 lo que sugiere una función como mediador a distancia de la lesión pulmonar inflamatoria[32]. También se ha demostrado

la secreción de HMGB1 por células de hipófisis anterior con el estímulo de TNF e IL-1[62].

Las células endoteliales responden ante HMGB1 causando aumento en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en una manera dependiente de dosis y tiempo. Además induce la secreción de TNF, IL-8, PAI-1 y tPA en éstas. La estimulación de células endoteliales con HMGB1 produce la fosforilación de MAPKs y la translocación de NF-kB[63].

HMGB1 está también asociada con la función de la barrera intestinal. HMGB1 incrementa la permeabilidad al dextrán de monocapas de células enterocíticas Caco-2A través de la formación de óxido nítrico. Asimismo, la administración de la "caja B" de HMGB1 aumenta la permeabilidad al dextrán de la mucosa del íleo y la translocación bacteriana hacia los nodos linfáticos mesentéricos[64].

En conjunto, estos datos sugieren que HMGB1 es un mediador importante en sepsis y en inflamación sistémica[59-61].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La sepsis y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) tienen una mortalidad del 30 al 70% y representan un costo elevado para las unidades de terapia intensiva. Diversos tratamientos han sido aprobados para tratar esta enfermedad sin el éxito esperado[32;65]. Esto es debido, en parte, a la heterogeneidad en la estratificación de los pacientes estudiados, y a la falta de analogía entre los modelos utilizados y el escenario clínico[16;32].

Desde el punto de vista molecular, existe la tendencia de estudiar mediadores proinflamatorios. En cambio, pocos trabajos se han dedicado a explicar el papel de los mediadores antiinflamatorios en este tipo de pacientes. Son aún menos los que reconocen que ambos tipos de mediadores son responsables de las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes con este síndrome.

Se ha propuesto a la pancreatitis aguda como modelo para el estudio de la respuesta inflamatoria y de sepsis[45] ya que presenta características hemodinámicas similares y perfiles de mediadores inflamatorios comparables a los encontrados en sepsis[66]. Además, en los pacientes con pancreatitis aguda se puede determinar con precisión el inicio del proceso inflamatorio, lo que permite estratificarlos adecuadamente. [67].

## **OBJETIVO GENERAL**

En el presente trabajo proponemos estudiar a pacientes con pancreatitis como modelo de inflamación sistémica. Se pretende delinear el perfil proinflamatorio (SIRS) y antiinflamatorio (CARS) para determinar la relación temporal entre ambos y la participación de la proteína HMGB1 en pacientes con esta enfermedad. Los resultados obtenidos en este trabajo sugerirán una función para HMGB1 en el contexto de la inflamación sistémica en general, y de la pancreatitis en particular.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la concentración de proteína C reactiva, IL-10 e INF- $\gamma$  en suero de pacientes con pancreatitis aguda leve y severa.

Determinar la concentración de HMGB1 sérica en pacientes con pancreatitis aguda leve y severa.

Determinar la expresión de TLR1, TLR2 Y TLR4 en la superficie de células mononucleares CD14+ de pacientes con pancreatitis aguda leve y severa.

## **HIPÓTESIS**

Los pacientes con pancreatitis leve presentarán una respuesta proinflamatoria seguida de una respuesta compensadora antiinflamatoria. En los casos de pancreatitis grave se observará una respuesta proinflamatoria inicial seguida por una respuesta antiinflamatoria compensadora severa que favorecerá la infección. La concentración de HMGB1 aumentará en los casos de pancreatitis severa complicada con infección.

## **METODOLOGÍA**

### **DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO**

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo, longitudinal y prospectivo de una cohorte. Se incluyeron 23 pacientes de los servicios de Terapia Intensiva, Cirugía General y Medicina Interna del Hospital Juárez de México perteneciente a la Secretaría de Salud y del Hospital Regional de Zona No.1 "Gabriel Mancera" perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social. La cohorte se integró con pacientes en los que se estableció el diagnóstico de pancreatitis aguda de acuerdo a criterios clínicos (dolor abdominal intenso con irradiación a la espalda), bioquímicos (aumento en la concentración de amilasa sérica) y de imagen (ultrasonido y/o tomografía axial computarizada) y que cumplieron con los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión:

- a. Pacientes con pancreatitis aguda de reciente inicio (< de 72 horas).
- b. Pacientes que acepten participar en el protocolo de investigación, mediante la firma del consentimiento informado.
- c. Pacientes con edades entre 18 y 60 años.

#### Criterios de no-inclusión:

- a. Pacientes con pancreatitis aguda con más de 72 horas de evolución.
- b. Pacientes postoperados.
- c. Pacientes con pancreatitis aguda bajo tratamiento con citocinas.
- d. Negativa de inclusión al protocolo por parte del médico o servicio tratante.
- e. Pacientes con enfermedades autoinmunes.
- f. Pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia primaria o secundaria conocida.
- g. Pacientes con infecciones, trauma severo o quemaduras.
- h. Pacientes con insuficiencia renal crónica o insuficiencia hepática.

#### Criterios de exclusión:

- a. Defunción en las primeras 48 horas después de iniciada la toma de muestras.
- b. Rechazo por el paciente y/o familiares para continuar en el protocolo.

Como población control se incluyeron 24 voluntarios clínicamente sanos con edades entre los 18 y los 60 años.

### **OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Los médicos adscritos al servicio correspondiente realizaron el diagnóstico de pancreatitis aguda e incluyeron a los pacientes en el estudio en función a los criterios de inclusión y exclusión. Se obtuvieron 10 ml de sangre de vena periférica o catéter central cada 12 horas durante los primeros tres días de internamiento. Posteriormente las muestras fueron tomadas cada 24 horas hasta cumplir 4 días de estancia. Una vez tomada la muestra fue transportada a la UIM Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI donde fue procesada. Se obtuvieron aproximadamente 20 mL de sangre venosa obtenidos de catéter central o punción en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson) de 10 mL con y sin heparina de sodio con el fin de obtener células mononucleares de sangre periférica o suero, respectivamente. La muestra sin aditivo permaneció 2 horas a temperatura ambiente. Se retiró el coágulo del tubo y se centrifugó (Rotina 35R®, Hettich) a 1,500 rpm por 10 minutos a 4°C. El suero resultante fue distribuido en tubos eppendorf de 0.5 mL y almacenado a 70 °C para la detección de citocinas. La sangre de los tubos con heparina fue procesada inmediatamente para la obtención de células mononucleares.

### **OBTENCIÓN Y SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Se mezcló un volumen de sangre con otro igual de solución salina isotónica en un tubo Falcon® (Corning) de 50 mL. En tubos Falcon® de 15 mL se colocaron 2 mL de Ficoll® (Hypaque) y se agregaron 11 mL de sangre previamente diluida. Se centrifugó a 1,500 rpm (380g) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró la fase de células mononucleares y se transfirieron las células mononucleares a un tubo Falcon® de 15 mL, agregando 14 mL con solución salina isotónica. Se centrifugó a 1,500 (380g) rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante por decantación y se resuspendió el botón de células. Se realizaron dos lavados más con solución salina isotónica centrifugando a 1,000 rpm (170)g por 10 minutos a temperatura ambiente. En cada ocasión se removió el sobrenadante y se resuspendió el botón. El contenido de todos los tubos fue vaciado a uno sólo, agregándose 2 mL de solución salina isotónica. Finalmente, se contó el número de células en hematocitómetro.

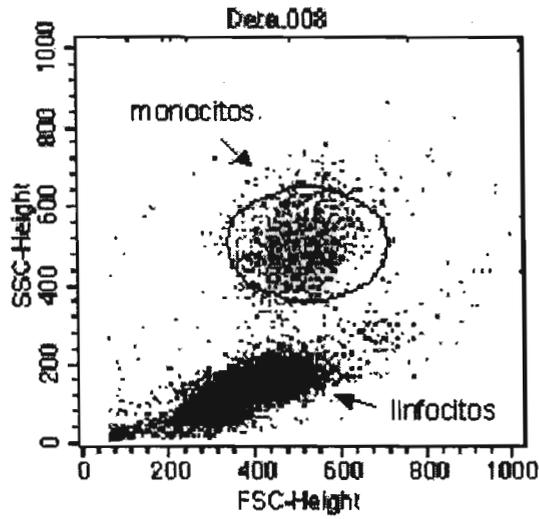
## **TINCIÓN DE MONONUCLEARES Y ADQUISICIÓN EN EL CITÓMETRO DE FLUJO**

Se colocaron  $5 \times 10^5$  células por pozo de una microplaca de 96 pozos. Se añadieron 100  $\mu$ L de solución de bloqueo (PBS, 0.1%  $\text{NaN}_3$ , 2% suero fetal bovino, 2% IgG humana, 5 mM EDTA, pH 7.4) a cada pozo y se dejó incubar la microplaca por 45 minutos sobre hielo. Posteriormente se centrifugó a 2,500 rpm (830g) por 3 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron las células y se agregaron 50  $\mu$ L de la solución de bloqueo con el anticuerpo de interés. Los anticuerpos utilizados fueron antiCD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), antiHLA-DR conjugado a ficoeritrina (PE), IgG2a e IgG1 conjugados a PE como control de isotipo (Becton Dickinson) y anti-TLR1, anti-TLR2 y anti-TLR4 conjugados a PE (eBioscience). La dilución utilizada fue de 1:10 para los anticuerpos antiHLA-DR, anti-TLR1, anti-TLR2, anti-TLR4 y los controles de isotipo. Se utilizó una dilución de 1:25 para anti-CD14. Las células se incubaron en oscuridad sobre hielo por 15 min. Se centrifugó la microplaca a 2,500 rpm (830g) por 3 min a 4 °C. Las células se decantaron y resuspendieron. Se añadieron 100  $\mu$ L de solución de tinción (PBS, 0.1%  $\text{NaN}_3$ , 2% suero fetal bovino, 5 mM EDTA, pH 7.4) a cada pozo. Se centrifugó a 2,500 rpm (830g) por 3 min a 4 °C y se repitió el lavado una vez más. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de solución de tinción y se transfirieron a tubos de poliestireno para citometría (Becton Dickinson) con 400  $\mu$ L de solución de tinción cada uno. La concentración final fue de  $1 \times 10^6$  células/mL.

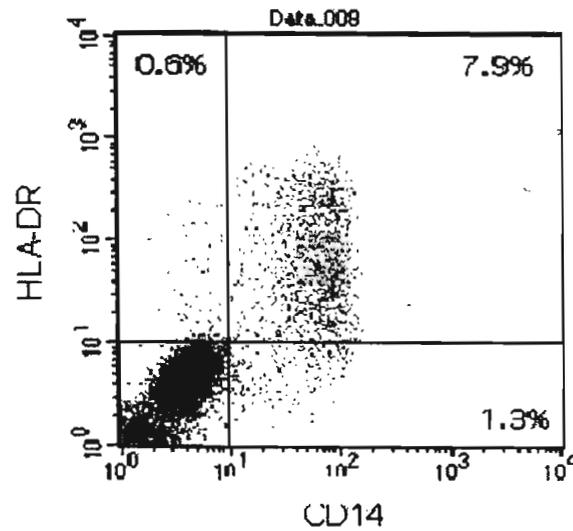
## **ADQUISICIÓN DE CÉLULAS EN CITÓMETRO**

Las muestras fueron adquiridas y analizadas en un citómetro FacsCalibur® (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest® (Becton Dickinson). Se adquirieron al menos 5,000 eventos de la zona de monocitos definida por tamaño y granularidad. Los resultados se expresan como la proporción de monocitos CD14+ que expresan HLA-DR, TLR1, TLR2 o TLR4 (figura 4). El tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta su tinción para ser leída en el citómetro siempre fue menor a 5 horas.

Figura 4. Expresión de HLA-DR en la superficie de monocitos



Monocitos identificados de acuerdo a su tamaño y granularidad en una muestra de células mononucleares de sangre periférica



Expresión de HLA-DR en la superficie de monocitos. 85% de los monocitos son positivos para HLA-DR

Paciente A  
 $7.9 / 1.3 + 7.9 =$   
**0.85**

## **DETECCIÓN DE HMGB1 EN SUERO**

Se filtraron 250 µL de suero a través de tubos Centricon 100® (Millipore), centrifugando a 3800 rpm por 60 minutos a 8 °C. Se tomaron 80 µL de la porción filtrada y se mezclaron con 80µL de buffer de corrimiento 1x (Tris-HCl pH 6.8, glicerol, SDS y azul de bromofenol) en un tubo eppendorf de 500 µL. Enseguida se hirvió la muestra por 3 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Las muestras (10 µL de cada una) se corrieron en un gel de poliacrilamida con un gradiente de concentración 10-20% (Tris-HCl, 26 pozos, Criterion, Biorad) a 200 V por 45 minutos. El buffer de corrimiento utilizado fue (Tris(hidroximetil)metilamina, glicina y SDS, pH 8.3). Se transfirió el contenido del gel a una membrana de PVDF (Immun-blot®, Biorad) a 25 V por 12 horas en cuarto frío y con hielo. Una vez transferida la membrana, se sumergió en solución de bloqueo (PBS, 0.2% Tween, 5% leche descremada) por 1 hora a temperatura ambiente. Al terminar se incubó por 12-18 horas a 4°C con anticuerpo policlonal anti-HMGB1 de conejo (purificado por afinidad, lote R241 obtenido de Kevin Tracey, NS-LIJ Research Institute), usando una dilución 1:250 con solución de bloqueo. Posteriormente, se lavó la membrana 4 veces por 15 minutos en cada ocasión con solución de lavado (PBS, 0.2% Tween). Se agregó segundo anticuerpo (cabra anti-conejo, F(ab)<sub>2</sub> conjugado a peroxidasa) usando una dilución 1:1,000 por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó nuevamente. Se utilizó luminol como sustrato (ECL kit®) y las membranas fueron reveladas en placas de radiografía en cuarto oscuro con 5-15 segundos de exposición. La lectura de los resultados se realizó en un densitómetro Biorad G800 usando el programa Quantity One (BioRad). Se utilizaron concentraciones conocidas de HMGB1 como estándar.

## **DETECCIÓN DE CITOCINAS EN SUERO**

La concentración de las citocinas IFN-γ e IL-10 se determinó mediante ELISA (OptEIA® Pharmingen). Se utilizaron placas de 96 pozos y se cubrieron con 100µL de una dilución de anticuerpo de captura diluido en solución reguladora (bicarbonato de calcio, carbonato de calcio, pH 9.5). La placa se incubó toda la noche a 2-8 °C y se lavó 3 veces con solución reguladora de lavado (PBS y 0.05% Tween-20). Los pozos fueron cubiertos con 200 µL de solución reguladora de bloqueo (PBS con suero fetal bovino al 10%, pH 7.0) y permanecieron en incubación por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con solución reguladora de lavado. Se prepararon diluciones seriadas del estándar dependiendo de la

citocina y por duplicado se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración estándar y 50  $\mu\text{L}$  por duplicado de cada muestra y controles. Las placas permanecieron en incubación por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 5 veces con solución reguladora de lavado. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución detectora (anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP, ésta última a una dilución 1:250) a cada pozo y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 7 veces con solución reguladora de lavado. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución sustrato (tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno) a cada pozo y se incubaron por 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido sulfúrico 2N e inmediatamente se leyó la placa a 450 nm. La concentración final de cada citocina se calculó automáticamente en el programa Biolinx en base a la curva estándar de cada placa.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La significancia estadística de las diferencias observadas en citocinas y marcadores de superficie entre pacientes con pancreatitis severa y grave fue calculada usando la prueba *t* de Student de dos colas.

## **RESULTADOS**

Se incluyeron un total de 23 pacientes. Se excluyeron 6 pacientes con pancreatitis leve por rehusarse a continuar en el estudio. De los 17 pacientes restantes, la edad promedio fue de 40 años y la distribución por sexo fue de 10 hombres y 7 mujeres (tabla 1).

La pancreatitis fue de origen biliar en 10 pacientes, alcohólica en 4 pacientes, hipertrigliceridemia en uno y no se determinó su origen en 2. Nueve casos fueron clasificados como pancreatitis leve y ocho como pancreatitis severa. Tres pacientes con pancreatitis severa fallecieron. El lapso entre el inicio de los síntomas y el ingreso al servicio de urgencias fue de 29.6 horas promedio. Los pacientes con pancreatitis leve no presentaron complicaciones infecciosas. Se obtuvo un cultivo positivo bacteriano en dos pacientes con pancreatitis severa.

La concentración de HMGB-1 y expresión de HLA-DR, TLR1, TLR2 y TLR4 en la superficie de monocitos de voluntarios sanos se encuentra en la figura 5.

### Proteína C reactiva

La concentración de proteína C reactiva en pacientes con pancreatitis leve inició con 11 mg/dL y presentó un incremento gradual hasta alcanzar 3 veces su valor inicial al segundo día para descender al valor basal al cuarto día. En pacientes con pancreatitis severa, la concentración fue de 13 pg/mL al ingreso alcanzando su máxima concentración a las 36 horas y descendió gradualmente hasta el cuarto día. La variación entre pacientes con pancreatitis severa en la concentración de proteína C reactiva fue considerable. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las observaciones (figura 6).

### IL-10

El promedio de la concentración de IL-10 en los pacientes con pancreatitis leve fue de 15 pg/mL a su ingreso y descendió progresivamente hasta 5 pg/mL al cuarto día. Los pacientes con pancreatitis severa presentaron al ingreso un promedio de 125 pg/mL. La concentración disminuyó rápidamente hasta 85 pg/mL a las 36 horas y siguió descendiendo hasta alcanzar su valor mínimo de 14 pg/mL al día 2.5. La concentración de IL-10 siempre fue mayor en los pacientes con pancreatitis severa

Paciente	Edad	Género	Etiología	Tiempo*	Severidad	Evolución
1 RGM	40	Masc	Idiopática	24	Severa	Defunción
2 LHM	31	Fem	Biliar	48	Leve	Alta
3 MZL	36	Masc	Alcohólica	48	Severa	Defunción
4 BHJ	28	Masc	Biliar	48	Severa	Alta
5 MMA	31	Fem	Trigliceridemia	48	Severa	Alta
6 PRS	21	Fem	Biliar	12	Leve	Alta
7 GGL	57	Masc	Biliar	24	Severa	Alta
8 GOR	56	Fem	Idiopática	12	Severa	Defunción
9 LBL	30	Masc	Alcohólica	48	Leve	Alta
10 MFM	35	Fem	Biliar	48	Leve	Alta
11 CMG	40	Masc	Biliar	12	Leve	Alta
12 MVR	54	Masc	Alcohólica	24	Severa	Alta
13 MRA	29	Masc	Alcohólica	24	Leve	Alta
14 EFS	49	Fem	Biliar	24	Leve	Alta
15 FCF	67	Masc	Biliar	24	Severa	Alta
16 CBS	36	Fem	Biliar	24	Leve	Alta
17 JNZ	42	Masc	Biliar	12	Leve	Alta

Tabla 1. Resumen de pacientes con pancreatitis aguda

\* Horas de evolución entre la aparición de dolor epigástrico y el ingreso al hospital

encontrándose diferencia estadísticamente significativa tan sólo a las 12 horas después del ingreso (figura 7).

#### INF- $\gamma$

Los pacientes con pancreatitis leve presentaron una concentración de INF- $\gamma$  de 12 pg/mL al ingreso, aumentó a las 12 horas y descendió a 9 pg/mL a las 36 horas. Los pacientes con pancreatitis severa iniciaron con 18 pg/mL y tendieron a permanecer por arriba de la concentración de los pacientes con pancreatitis aguda hasta el segundo día y al tercer día alcanzó su concentración mínima (5 pg/mL). Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los días (figura 8).

#### HLA-DR/CD14

El porcentaje de células mononucleares de sangre periférica CD14+ que expresan HLA-DR en su superficie en voluntarios sanos fue de 97% promedio. En el caso de pacientes con pancreatitis leve (PL) dicho porcentaje fue de 85% al ingreso y descendió hasta 58% en las primeras 12 horas. El porcentaje aumentó gradualmente hasta 71% a los cuatro días. Los pacientes con pancreatitis severa se presentaron al ingreso con 57% y fluctuaron a lo largo de cuatro días con una expresión mínima de 46% a las 36 horas. Aunque la expresión de HLA-DR en pacientes con pancreatitis leve siempre fue mayor a la de pacientes con pancreatitis severa, la diferencia sólo alcanzó significancia estadística al ingreso (figura 9).

#### TLR1/CD14

La expresión de TLR1 en la superficie de monocitos de voluntarios sanos fue de 75% promedio. A su ingreso, los pacientes con pancreatitis leve fue de 34% y descendió a 20% a las 12 horas. La expresión se mantuvo constante hasta el final del periodo observado. Los pacientes con pancreatitis severa presentaron al ingreso 31% y la expresión de TLR1 tendió a aumentar hasta 42% a las 36 horas alcanzando una meseta hasta el segundo día para descender a 8% al tercer día. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las mediciones (figura 10).

#### TLR2/CD14

El promedio en la expresión de TLR2 en monocitos de voluntarios sanos fue de 50%. Los pacientes con variedad leve ingresaron con un promedio de expresión de 50% y disminuyeron a 21% a las 12 horas. El porcentaje de expresión aumentó a 33% en el día 2.5 para terminar en 24% al cuarto día. Los pacientes con pancreatitis severa ingresaron con 22% disminuyeron a 12% y ascendieron hasta 67% en el día 4. La diferencia entre grupos no alcanzó significancia estadística en ninguno de los puntos estudiados (figura 11).

#### TLR4/CD14

Los voluntarios sanos presentaron un promedio de expresión de TLR4 de 6%. Al ingreso, los monocitos de pacientes con pancreatitis leve y severa presentaron un porcentaje de expresión de 19 y 17%, respectivamente. El comportamiento en ambos grupos de pacientes fue similar, permaneciendo estable hasta el cuarto día y nunca superó 20%. No hubo diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las mediciones (figura 12).

#### HMGB1

La concentración de HMGB1 en el grupo de pancreatitis leve fue de 751 ng/mL al ingreso. El concentración aumentó y disminuyó durante el periodo de estudio. La concentración máxima alcanzada fue de 920 ng/mL al día 2.5. El grupo de pacientes con pancreatitis severa presentó una concentración inicial de 811 ng/mL y fue mayor que el grupo con pancreatitis leve hasta el día 2.5. A partir del segundo día, la concentración fue mayor en el grupo con pancreatitis leve. Sólo se observó significancia estadística al segundo día (figura 13).

La concentración de citocinas y expresión de marcadores en la superficie de monocitos, así como el tamaño de la muestra para cada determinación, se muestran en la tabla 2.

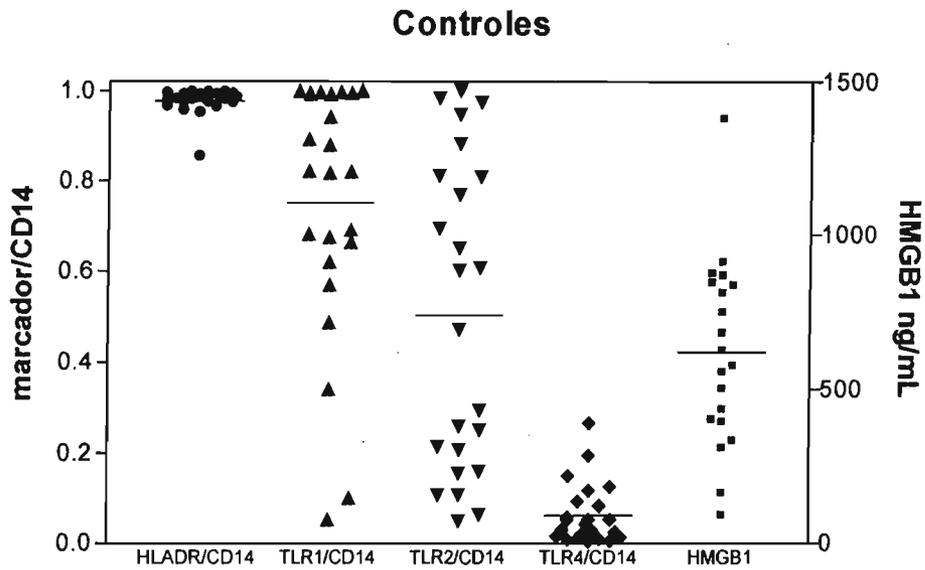


Figura 5. Concentración de HMGB1 y expresión de HLA-DR, TLR1, TLR2 y TLR4 en la superficie de monocitos de voluntarios sanos. La línea indica el promedio.

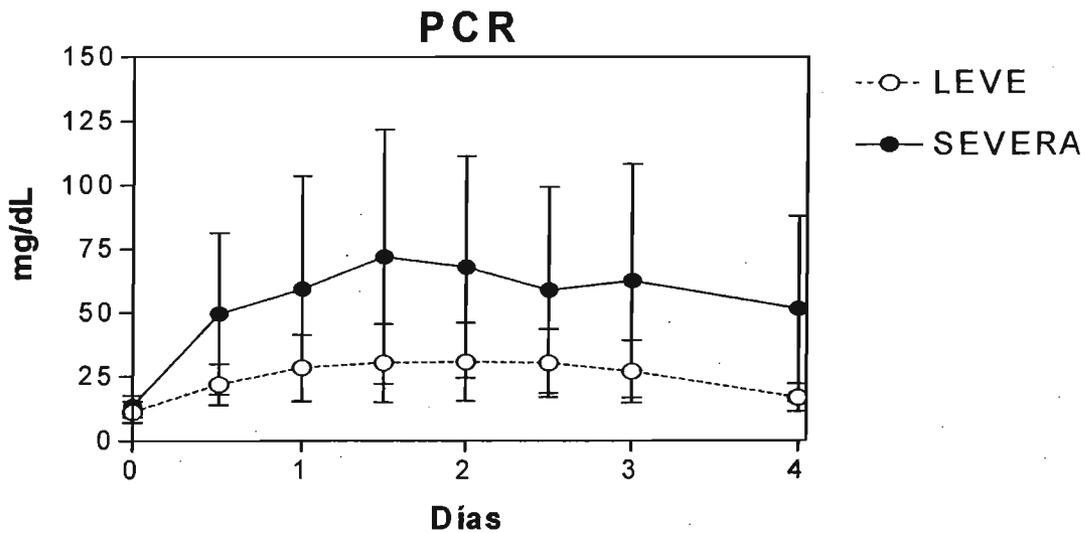


Figura 6. Concentración de PCR en suero de pacientes con pancreatitis aguda.

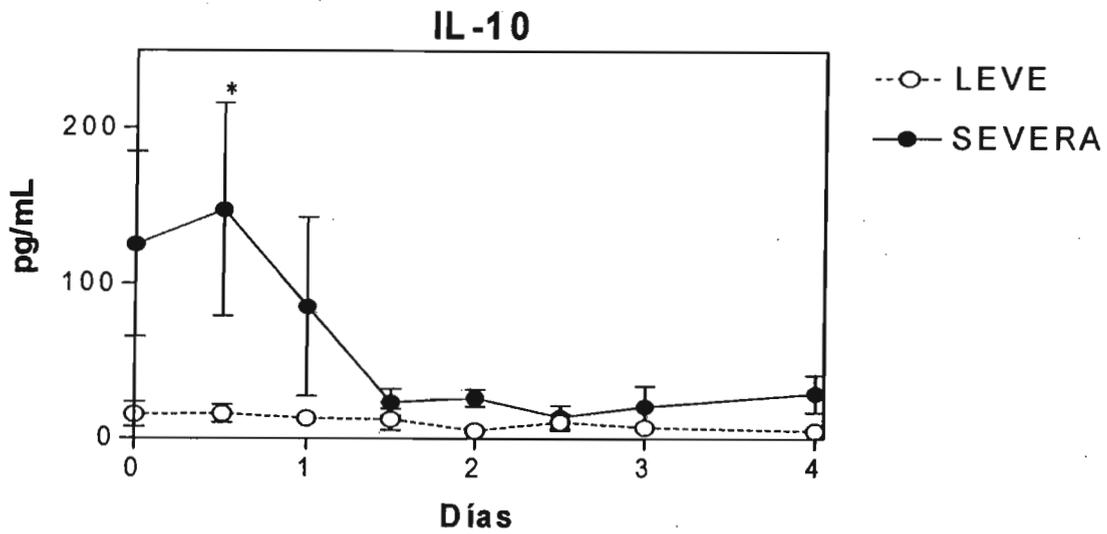


Figura 7. Concentración de IL-10 en suero de pacientes con pancreatitis aguda. \*p < 0.05

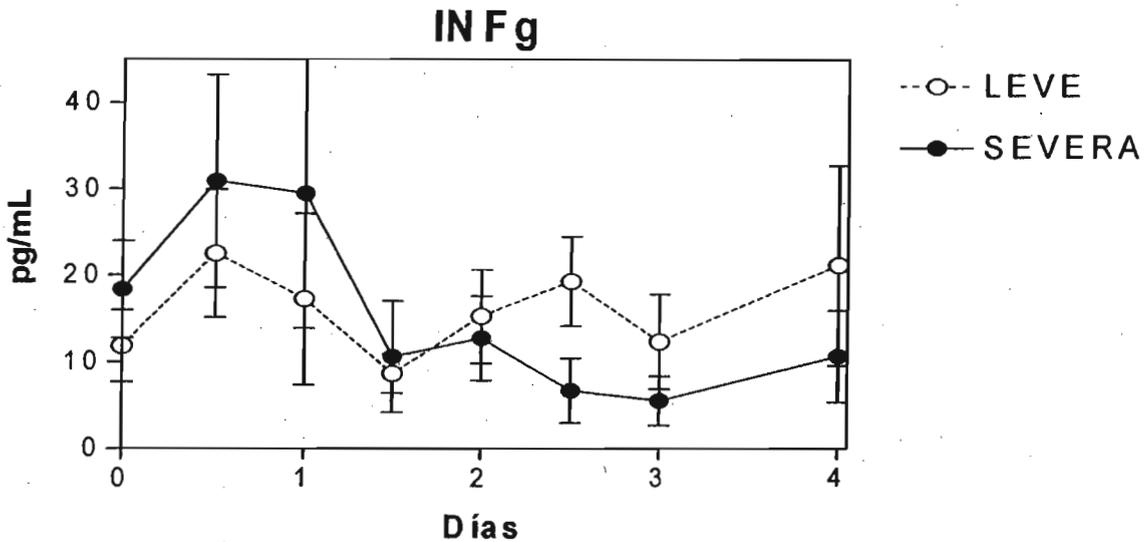


Figura 8. Concentración de INF-γ en suero de pacientes con pancreatitis aguda.

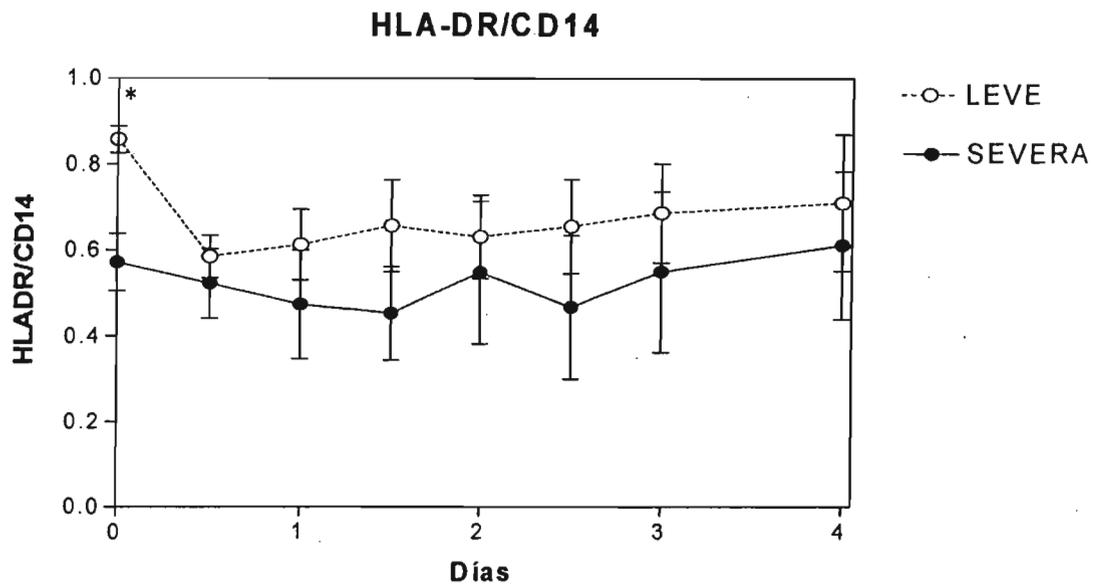


Figura 9. Expresión de HLA-DR en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda. \*p < 0.05

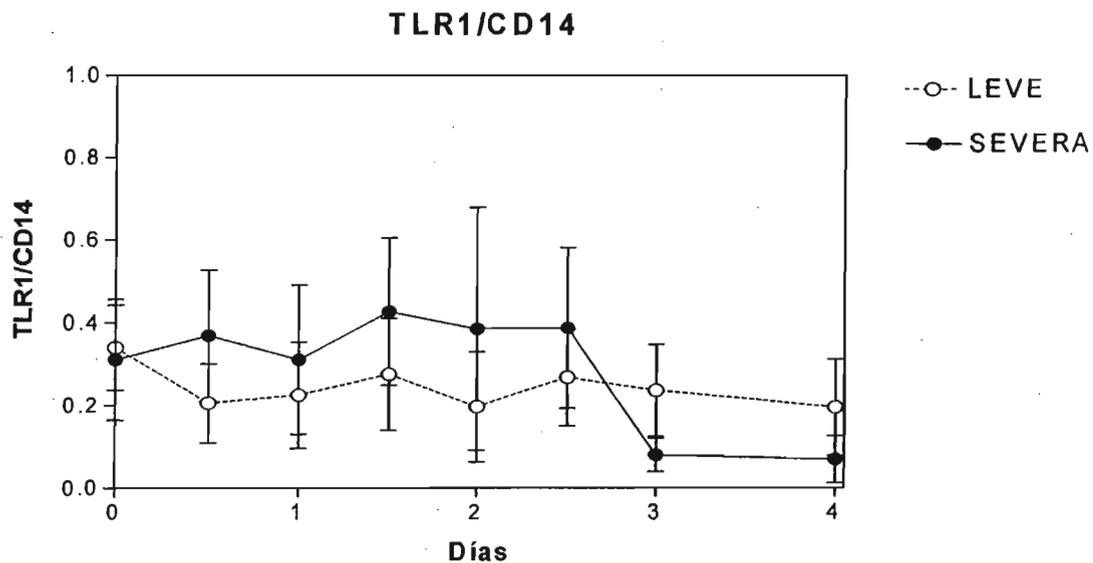


Figura 10. Expresión de TLR1 en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda.

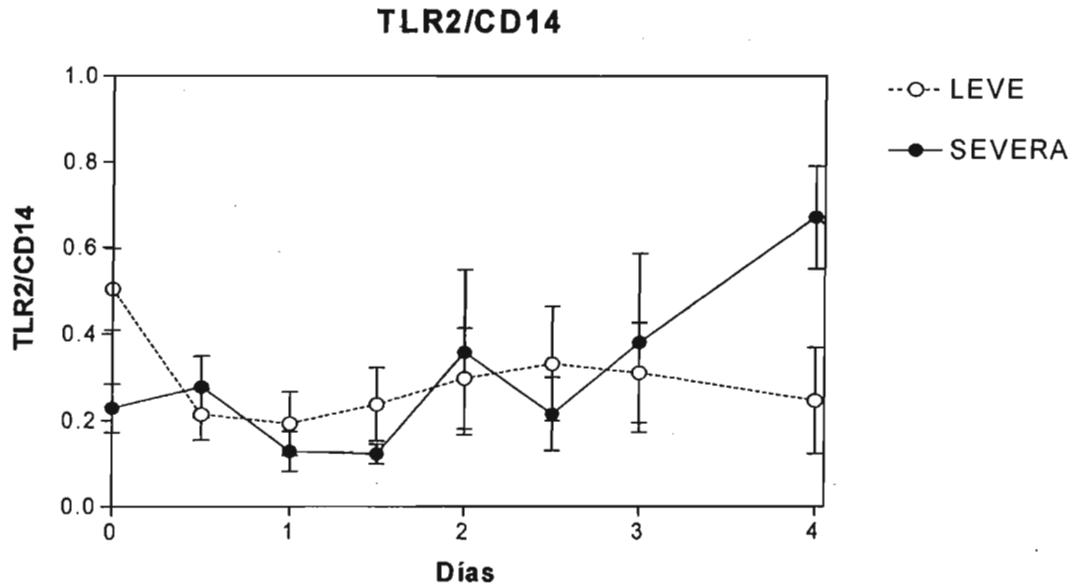


Figura 11. Expresión de TLR2 en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda.

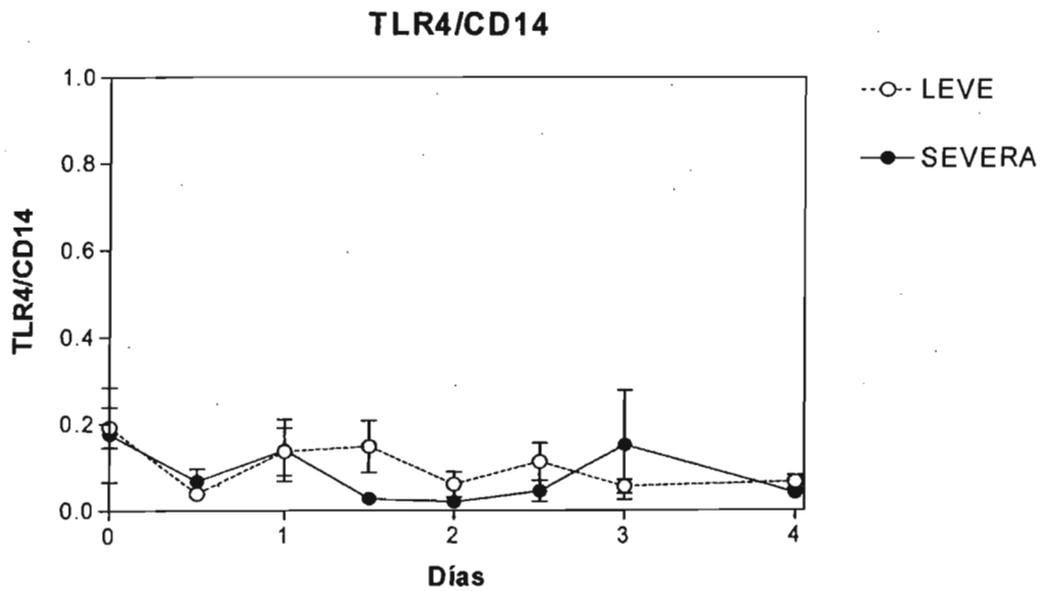


Figura 12. Expresión de TLR4 en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda.

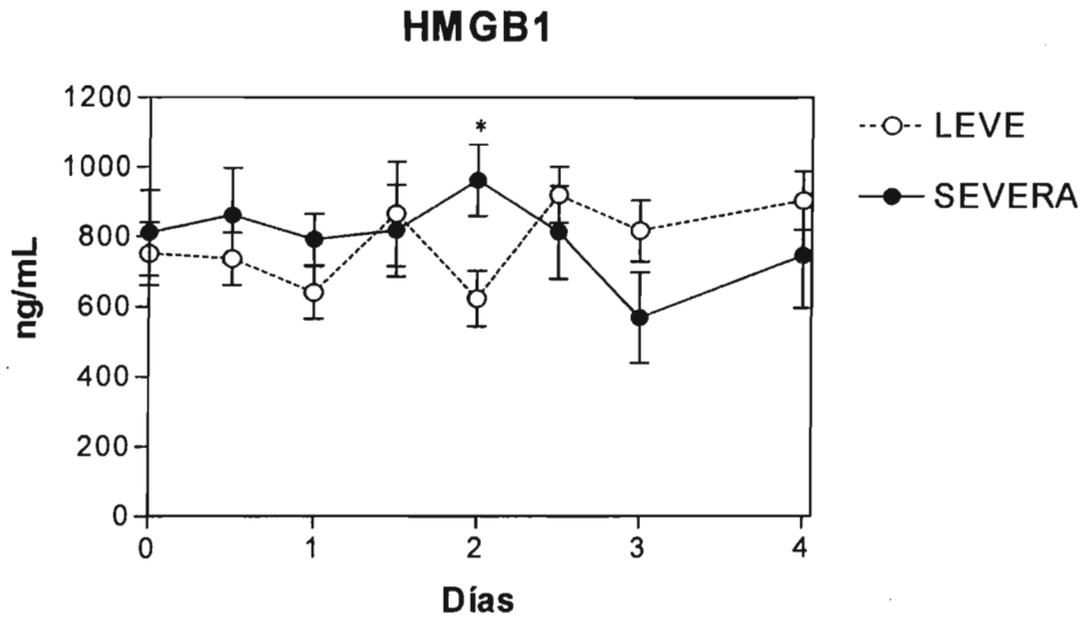


Figura 13. Expresión de HMGB1 en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda. \*p < 0.05

		Día 0	Día 0.5	Día 1	Día 1.5	Día 2	Día 2.5	Día 3	Día 4
PCR	LEVE	11 ± 4 (9)	22 ± 7 (9)	28 ± 9 (9)	30 ± 10 (9)	31 ± 10 (9)	30 ± 10 (8)	27 ± 9 (8)	17 ± 6 (8)
	SEVERA	13 ± 5 (7)	49 ± 17 (8)	59 ± 24 (6)	72 ± 32 (5)	68 ± 30 (5)	59 ± 26 (5)	63 ± 31 (4)	51 ± 26 (4)
IL-10	LEVE	15 ± 6 (7)	16 ± 6 (8)	13 ± 5 (8)	12 ± 5 (7)	5 ± 2 (7)	11 ± 4 (7)	7 ± 2 (8)	5 ± 2 (7)
	SEVERA	125 ± 47 (7)	148 ± 60 (6)	85 ± 35 (6)	23 ± 12 (4)	26 ± 13 (4)	14 ± 7 (4)	20 ± 11 (3)	29 ± 14 (4)
INF	LEVE	12 ± 4 (8)	22 ± 7 (9)	17 ± 6 (9)	9 ± 3 (8)	15 ± 5 (8)	19 ± 7 (7)	12 ± 4 (8)	21 ± 8 (7)
	SEVERA	18 ± 7 (7)	31 ± 11 (7)	30 ± 11 (7)	10 ± 4 (5)	13 ± 6 (5)	7 ± 3 (5)	5 ± 3 (3)	11 ± 5 (4)
HLADR	LEVE	0.85 ± 0.32 (7)	0.58 ± 0.24 (6)	0.61 ± 0.27 (5)	0.65 ± 0.27 (6)	0.63 ± 0.28 (5)	0.65 ± 0.27 (6)	0.68 ± 0.28 (6)	0.71 ± 0.32 (5)
	SEVERA	0.57 ± 0.23 (6)	0.52 ± 0.23 (5)	0.47 ± 0.24 (4)	0.45 ± 0.20 (5)	0.54 ± 0.31 (3)	0.46 ± 0.23 (4)	0.54 ± 0.27 (4)	0.61 ± 0.31 (4)
TLR1	LEVE	0.34 ± 0.11 (9)	0.20 ± 0.07 (9)	0.22 ± 0.08 (7)	0.27 ± 0.10 (8)	0.19 ± 0.07 (7)	0.26 ± 0.09 (8)	0.23 ± 0.08 (8)	0.19 ± 0.07 (8)
	SEVERA	0.31 ± 0.12 (7)	0.36 ± 0.14 (7)	0.31 ± 0.14 (5)	0.42 ± 0.17 (6)	0.38 ± 0.22 (3)	0.38 ± 0.19 (4)	0.08 ± 0.05 (3)	0.06 ± 0.03 (3)
TLR2	LEVE	0.50 ± 0.17 (9)	0.21 ± 0.07 (9)	0.19 ± 0.07 (7)	0.23 ± 0.08 (8)	0.29 ± 0.11 (7)	0.33 ± 0.12 (8)	0.31 ± 0.11 (8)	0.24 ± 0.08 (8)
	SEVERA	0.22 ± 0.09 (6)	0.27 ± 0.11 (6)	0.12 ± 0.05 (5)	0.12 ± 0.05 (6)	0.35 ± 0.20 (3)	0.21 ± 0.11 (4)	0.38 ± 0.22 (3)	0.67 ± 0.47 (2)
TLR4	LEVE	0.19 ± 0.07 (8)	0.03 ± 0.01 (8)	0.13 ± 0.05 (7)	0.14 ± 0.05 (7)	0.05 ± 0.02 (7)	0.11 ± 0.04 (7)	0.05 ± 0.02 (7)	0.06 ± 0.02 (8)
	SEVERA	0.17 ± 0.06 (7)	0.06 ± 0.02 (7)	0.13 ± 0.06 (5)	0.02 ± 0.01 (6)	0.01 ± 0.01 (3)	0.04 ± 0.02 (4)	0.15 ± 0.09 (3)	0.04 ± 0.03 (3)
HMGB1	LEVE	751.2 ± 266 (8)	736.3 ± 260 (8)	640.5 ± 213 (9)	865.0 ± 306 (8)	623.6 ± 220 (8)	920.4 ± 325 (8)	817.2 ± 289 (8)	903.9 ± 320 (8)
	SEVERA	811.0 ± 331 (6)	861.1 ± 304 (8)	791.6 ± 323 (6)	817.2 ± 334 (6)	962.5 ± 481 (4)	813.0 ± 364 (5)	569.3 ± 329 (3)	746.0 ± 373 (4)

Tabla 2. Resumen de marcadores de superficie de monocitos y citocinas en suero. HLA-DR, TLR1, TLR2, TLR4 se expresan como la proporción de monocitos que expresan dichos marcadores.

## DISCUSIÓN

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína de fase aguda utilizada como indicador no específico de inflamación. Su concentración correlaciona con la gravedad de los pacientes con sepsis, pancreatitis y otras enfermedades inflamatorias[68-70]. Durante el proceso de inflamación, la producción de PCR por el hígado es inducida por IL-6 y TNF siendo su concentración proporcional a la concentración de estas citocinas[71].

Como era de esperar, la PCR se encontró elevada en los pacientes de este estudio. Al ingreso, la concentración de PCR fue comparable en ambos grupos de pacientes (pancreatitis leve y severa). Sin embargo, a las 12 horas de ingreso y hasta el cuarto día, los pacientes con pancreatitis severa presentaron niveles de PCR más elevados pero sin diferencia estadística. Estos hallazgos son similares a los reportados por otros autores en pacientes con pancreatitis aguda. Pezzilli et al. [72] determinaron la concentración de PCR al ingreso y Heresbach et al.[73] lo hicieron al tercer día. Ninguno encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de pacientes.

Estos hallazgos podrían ser explicados por la variabilidad en la concentración de PCR en el grupo de pacientes con pancreatitis grave. De Beaux[74] y Leser[75], encontraron diferencias significativas en la concentración de IL-6 y PCR en pacientes con pancreatitis grave entre aquéllos que sobrevivieron y los que fallecieron. Además, en este grupo de pacientes, encontraron un correlación estrecha entre la concentración de IL-6 y PCR, y que la aparición de IL-6 fue seguida por la de PCR.

La diferencia en los niveles de PCR entre ambos grupos, aunque no significativa, sugiere la presencia de un proceso inflamatorio de mayor magnitud en los pacientes con pancreatitis severa. Asumiendo que IL-6 es el principal inductor de la síntesis de proteínas de fase aguda, y por tanto de PCR, los pacientes con pancreatitis severa cursaron con niveles más altos de IL-6. El hecho de que la PCR también haya presentado niveles elevados en los pacientes con pancreatitis leve sugiere que ambos tipos de pacientes presentaron una reacción proinflamatoria.

IL-10 es una citocina antiinflamatoria sintetizada principalmente por monocitos, linfocitos T y B. Entre algunas

de sus funciones, IL-10 inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, TNF e IL-2 [76;77]. El rol de IL-10 en pancreatitis aguda no es claro. Se ha reportado que se encuentra más elevada en pacientes con pancreatitis leve y que en este escenario ejerce una actividad antiinflamatoria protectora[78]. En contraste, otros estudios reportaron la situación inversa y su elevación fue marcador de severidad[79;80].

En este trabajo, los casos de pancreatitis leve presentaron concentraciones de IL-10 constantes a lo largo del estudio. Por su parte, los casos de pancreatitis severa presentaron un valor elevado al ingreso, alcanzaron un pico a las 12 horas y disminuyeron hasta alcanzar el nivel de los pacientes con pancreatitis leve al segundo día. La concentración de IL-10 siempre fue menor en los casos leves que en los casos severos aunque los resultados obtenidos no alcanzaron significancia estadística. Esta observación es similar a la reportada por Wereszczynska et al.[77] quienes encontraron que en pacientes con pancreatitis severa, IL-10 se encuentra más elevada que en los casos leves, manteniéndose este comportamiento a lo largo del periodo observado (10 días).

IL-10 ha sido utilizada de manera preventiva en pacientes sometidos a colangiografía, un procedimiento diagnóstico que puede causar pancreatitis[81]. Además, la administración de IL-10 reduce la respuesta inflamatoria local y la subsecuente mortalidad por pancreatitis en ratones[82]. IL-10 por tanto, podría desempeñar un papel protector o nocivo dependiendo de su concentración y del momento de su aparición.

El origen de INF- $\gamma$  en la pancreatitis es incierto. INF- $\gamma$  es una citocina producida por células NK y linfocitos T ante el estímulo de IL-12[83]. Éste último requiere de IL-12 más la presentación de antígeno para producir y liberar INF- $\gamma$ .

Uehara, et. al. [84] encontraron que la concentración de INF- $\gamma$  fue mayor en los casos de pancreatitis severa, alcanzando un pico al segundo día después del ingreso. También determinaron la concentración de IL-12 que alcanzó un pico a los días 0 y 1 y fue mayor en los casos severos, encontrándose una correlación positiva entre la concentración de estas dos citocinas. Pezzilli reportó que la concentración de IL-12 en pacientes con pancreatitis fue significativamente mayor solamente en el primer día disminuyendo posteriormente al nivel de los controles[85]. En este trabajo los pacientes

con pancreatitis severa presentaron una concentración mayor de INF- $\gamma$  al momento de ingreso y hasta las 36 horas.

Aunque en esta serie de pacientes se encontró INF- $\gamma$  elevada al inicio del padecimiento, la pancreatitis está asociada inicialmente a un proceso inflamatorio estéril, lo que hace improbable que el linfocito T sea la fuente de esta citocina. En cambio, las células NK pueden liberar INF- $\gamma$  tan sólo con la estimulación de IL-12. Carson, et. al. [86] encontraron que la inyección simultánea de IL-12 e IL-2 causa choque y mortalidad en ratones. Sin embargo, dicho efecto está ausente en ratones deficientes de células NK sugiriendo que esta población celular tiene un papel relevante en la inflamación sistémica.

El uso de la expresión de HLA-DR en monocitos está basado en la observación de que dicha expresión se encuentra disminuida en diversas formas de inflamación sistémica. Este fenómeno está asociado a la incapacidad para presentar antígenos al linfocito T, y por tanto, a infecciones secundarias[36;87-89].

En este estudio se observó disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos de pacientes con pancreatitis aguda y severa con respecto a la expresión encontrada en voluntarios sanos. La expresión tendió a ser menor en los casos severos que en los casos leves aunque sólo se encontró significancia estadística al ingreso. Es de notar que los pacientes con pancreatitis leve ingresaron con niveles de expresión de HLA-DR casi similares a los de la población control, disminuyendo drásticamente en las primeras 12 horas. A partir de entonces, el porcentaje aumentó lentamente hasta alcanzar el nivel inicial. En diversos estudios se ha encontrado hallazgo similar: La expresión de HLA-DR regresa a su nivel original más rápidamente en los casos de pancreatitis leve que en los casos severos. En estos estudios HLA-DR correlacionó con complicaciones y mortalidad [90-93].

La expresión de HLA-DR en monocitos está regulada por IL-10[94], TGF- $\beta$ [95], INF- $\gamma$ [36;88;96], y cortisol[97]. Aunque la falta de significancia estadística impide hacer un análisis adecuado, en los pacientes estudiados la expresión de HLA-DR parece variar inversamente a la concentración de IL-10. En ambos grupos de pacientes, la baja expresión de HLA-DR podría ser causada por IL-10. Wolk, et. al. [34], encontraron que la expresión de HLA-DR estaba disminuida en monocitos tratados con LPS o IL-10. Dicha disminución fue de

menor intensidad en los monocitos estimulados con IL-10 y el nivel de expresión de HLA-DR regresó a su nivel basal más rápidamente. Recientemente, Monneret[95] encontró correlación entre la concentración de IL-10 y la disminución de HLA-DR en pacientes con sepsis. Además, no se encontró correlación entre HLA-DR y TGF- $\beta$ . Los autores sugieren que IL-10 es responsable de la disminución de HLA-DR observada en los pacientes con sepsis.

INF- $\gamma$  también está asociada a la expresión de HLA-DR en monocitos. De hecho, se ha sugerido su uso en pacientes con sepsis que presentan disminución de HLA-DR[36]. En este trabajo, la concentración de INF- $\gamma$  fue mayor en los casos de pancreatitis severa hasta las 36 horas. A partir de entonces, los pacientes con pancreatitis leve expresaron más INF- $\gamma$ . En los casos severos, se encontró un aumento temprano en INF- $\gamma$  y disminución simultánea de HLA-DR, es decir un proceso proinflamatorio y otro antiinflamatorio.

Se puede especular que la baja expresión de HLA-DR en monocitos de pacientes con pancreatitis severa se debe a que en éstos hay un aumento inicial de IL-10 seguido por una baja concentración de INF- $\gamma$ . Es decir, IL-10 podría ser responsable de la disminución de HLA-DR cuya expresión permanecería abatida por la baja expresión de INF- $\gamma$ . En cambio, en los pacientes con pancreatitis leve IL-10 no aumenta lo suficiente para disminuir la expresión de HLA-DR, como lo hace en los pacientes graves. Posteriormente, la alta concentración de INF- $\gamma$  en los casos leves aumentaría gradualmente la expresión de HLA-DR.

El CARS se define como la expresión de HLA-DR en menos del 30% de monocitos circulantes conjuntamente con la disminución en la capacidad de secreción de citocinas proinflamatorias *in vitro* con la estimulación de LPS[16]. Desde el punto de vista de la expresión de HLA-DR solamente tres pacientes con pancreatitis severa presentaron CARS, y de éstos, dos desarrollaron sepsis. Sin embargo, si se considera la baja expresión de HLA-DR en ambos grupos de pacientes, es evidente que tanto en pacientes con pancreatitis leve como aquéllos con pancreatitis severa se estableció una respuesta antiinflamatoria. A pesar de que no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de HLA-DR entre ambos grupos, los pacientes con pancreatitis severa tendieron a presentar valores más bajos. Otros trabajos han confirmado esta observación y han encontrado significancia estadística en la expresión de HLA-DR entre ambos

grupos[92;93]. Tomando en cuenta estos hallazgos se puede considerar que el proceso antiinflamatorio es de mayor magnitud en los casos de pancreatitis severa.

La definición de CARS se acuñó en estudios de pacientes séptico y está basada en el fenómeno de "inmunoparálisis", que se presenta en pacientes después de cirugía, trauma, quemaduras y sepsis. Aún queda por confirmar si la presencia de CARS en pacientes con pancreatitis aguda también se asocia a una deficiencia transitoria de INF- $\gamma$  ocasionada por una alteración en la respuesta inmune innata.

Las células que median la respuesta inmune innata expresan TLRs que les permiten reconocer estructuras conservadas de microorganismos e iniciar una respuesta inflamatoria. La expresión de estos receptores se encuentran aumentada en casos de infección y sepsis[101-103]. Considerando que la respuesta inflamatoria inicial en la pancreatitis es aséptica[98] y que la infección es una de sus complicaciones[99;100], el estudio de la expresión de TLRs puede ofrecer información sobre una complicación séptica durante el transcurso de la pancreatitis.

La variabilidad encontrada y la falta de significancia estadística en la expresión de TLR1, TLR2 y TLR4 dificulta su análisis. Es de notar la baja expresión de TLR1 y TLR2 encontrada en todos los pacientes. En el grupo de controles sanos, la expresión de estos dos receptores varió de 10 a 100%.

En el caso particular de un paciente con pancreatitis severa, la expresión de TLR4 presentó dos picos muy bien definidos. El primero a las 24 horas y el segundo al séptimo día (figura 14). En ambos casos, el cambio en la expresión ocurrió entre dos muestras (12 horas o menos). El segundo pico, se presentó justo cuando se diagnosticó la presencia de infección por *Staphylococcus aureus*; en este momento TLR2 también alcanzó su expresión máxima. Simultáneamente, la expresión de HLA-DR alcanzó su expresión más baja, lo que quizá haya ocasionado predisposición a la infección como se ha sugerido en casos de pancreatitis y traumatismo[88;93]. Resulta interesante especular sobre la posibilidad de que el aumento en la expresión de TLR2 sea consecuencia de la presencia de esta bacteria gram-positiva.

Recientemente se determinó que la inyección en ratones de heparán sulfato o elastasa (que cataliza y libera

proteoglicanos de heparán sulfato) provoca una respuesta inflamatoria sistémica y falla orgánica múltiple similar a SIRS. Además se encontró que este efecto depende de TLR4[104]. Esta es otra evidencia a favor de que ligandos endógenos como fibronectina pueden activar el sistema inmune innato a través de TLRs[105]. En el caso de la pancreatitis aguda cuyo origen es aséptico y donde se ha demostrado la liberación inicial de elastasa pancreática[106], la respuesta inflamatoria original podría estar ocasionada por la activación de algún TLR y su ligando endógeno. Este fenómeno es explicado por la teoría de la "señal de peligro" que propone que el sistema inmune no distingue lo propio de lo extraño sino que más bien responde a antígenos (tanto moléculas ajenas como propias) que sólo se presentan en situaciones nocivas[107].

Además de ser un mediador tardío de sepsis y ser secretado activamente por macrófagos y otras células, HMGB1 también es liberado pasivamente durante el proceso de necrosis. Se ha determinado que puede señalizar a través de diversos receptores, entre ellos RAGE, TLR2 y TLR4 para efectuar su acción proinflamatoria[108-110].

En este trabajo no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la concentración de HMGB1 entre pacientes con pancreatitis leve y severa en ninguno de los puntos estudiados. Tampoco es fácil establecer alguna tendencia debido a la variación en su comportamiento. Además, los valores determinados en los pacientes no son significativamente diferentes a los obtenidos en los controles.

En el mismo paciente referido anteriormente, se observó un pico inicial a las 24 horas y otro al día 12. Si el paciente se encontraba séptico a partir del sexto día, el aumento de HMGB1 al día 12 podría reflejar HMGB1 procedente de la liberación activa proveniente de macrófagos (figura 15). Queda también por determinar si el daño celular inicial en el páncreas además de liberar enzimas pancreáticas, puede liberar HMGB1 u otras "señales de peligro" (elastasa o heparán sulfato, por ejemplo) capaces de activar el sistema inmune innato a través de TLRs o RAGE (figura 16).

### Expresión de TLR2 y TLR4 en un caso de pancreatitis severa

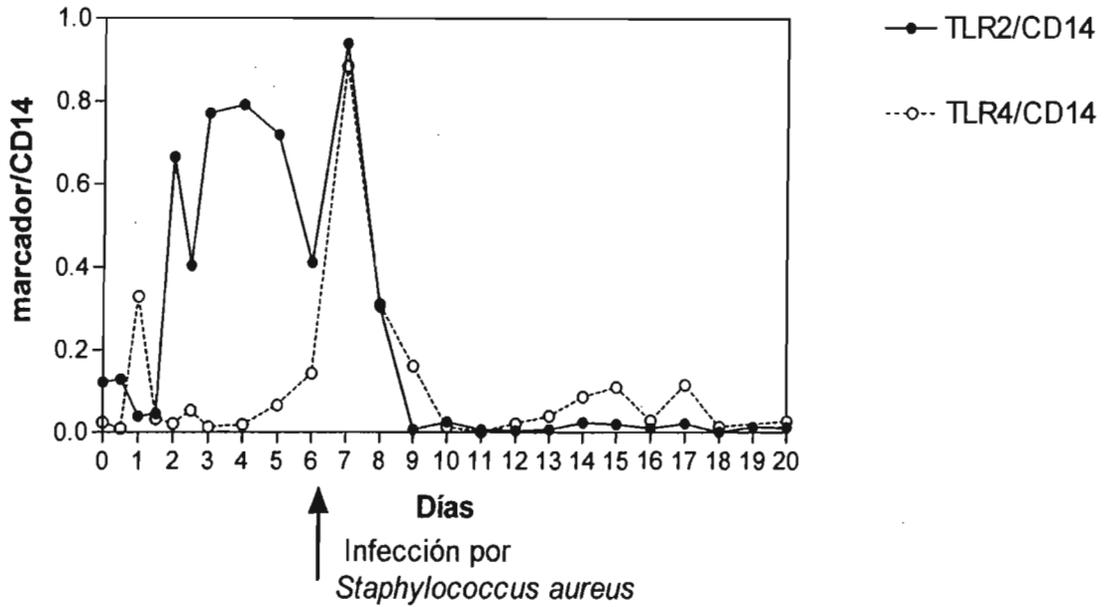


Figura 14. Expresión de TLR2 y TLR4 en un caso de pancreatitis severa.

### Expresión de HLADR y HMGB1 en una caso de pancreatitis severa

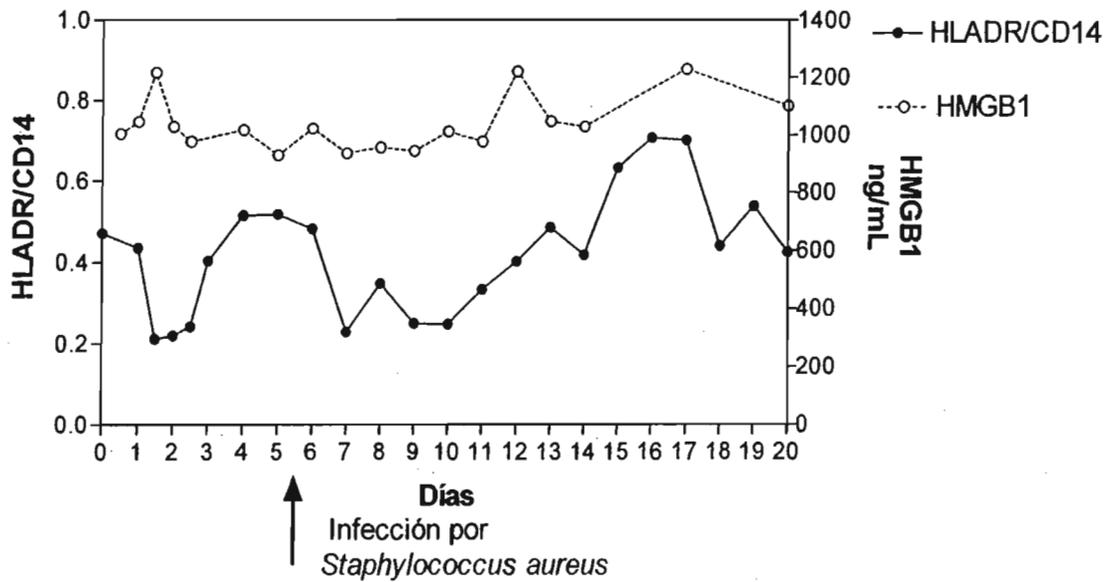
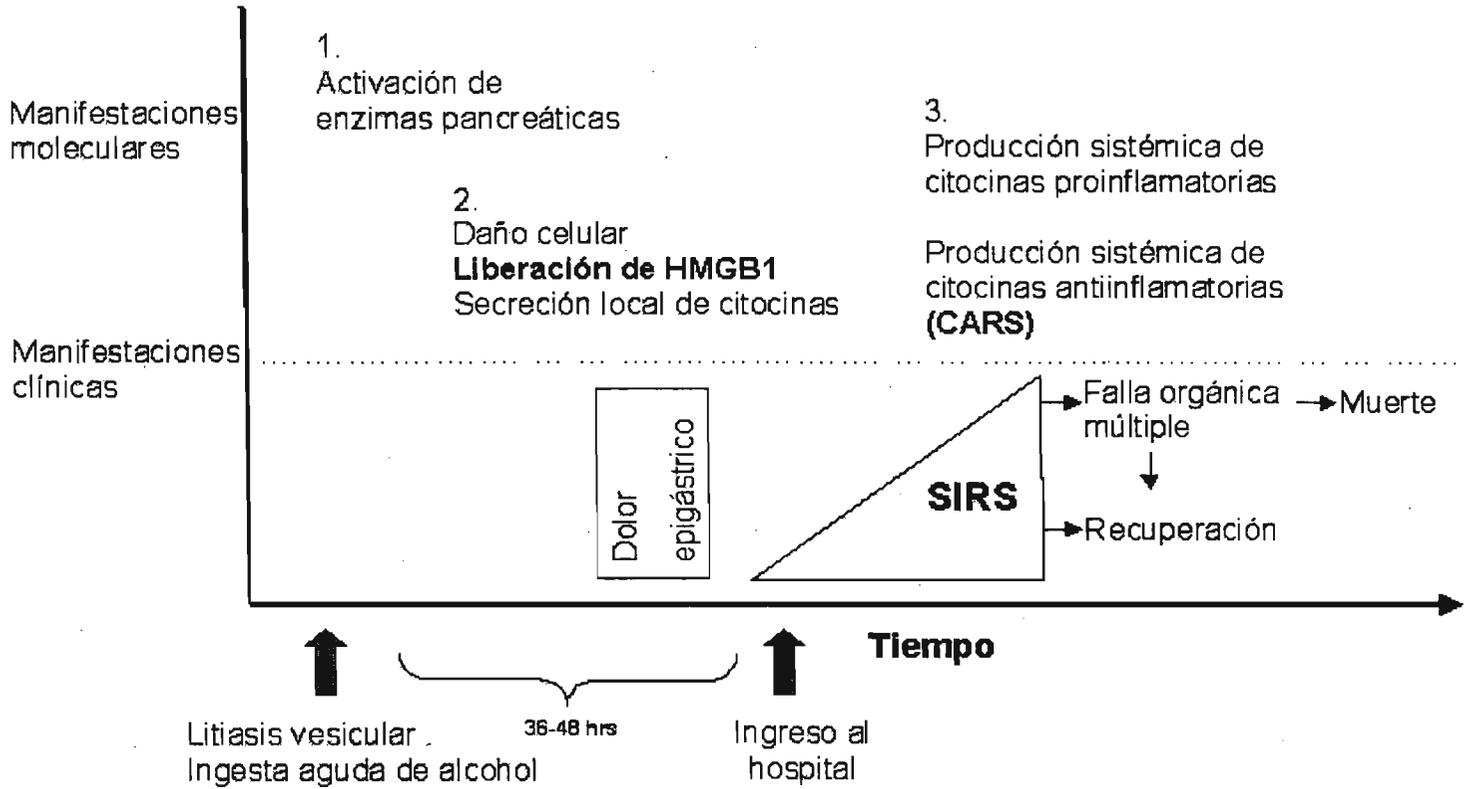


Figura 15. Expresión de HLA-DR y HMGB1 en un caso de pancreatitis severa (mismo paciente que en la figura 10).

Figura 16. Manifestaciones clínicas y moleculares en pacientes con pancreatitis



## CONCLUSIONES

Los pacientes con pancreatitis aguda presentaron una respuesta tanto proinflamatoria (medida en términos de PCR y INF- $\gamma$ ) como antiinflamatoria (HLA-DR e IL-10). En el caso de los pacientes con pancreatitis leve, ambos tipos de respuesta fueron de menor magnitud que en los pacientes con pancreatitis grave.

Todos los casos de pancreatitis severa presentaron disminución de HLA-DR en la superficie de monocitos. Tres pacientes con pancreatitis severa presentaron CARS (expresión de HLA-DR menor a 30% en algún momento del estudio) y dos de ellos desarrollaron sepsis.

La expresión de TLR1, TLR2 y TLR4 en la superficie de monocitos de pacientes con pancreatitis aguda no presentó un patrón de comportamiento específico. En un paciente con complicación séptica, se observó incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 justo al inicio de la infección. El rol que llevan a cabo estos receptores al inicio de la respuesta inflamatoria en pancreatitis aguda es incierto.

HMGB1 se encontró elevada en pacientes con pancreatitis aguda aunque sin significancia estadística si se le compara con los controles. La presencia temprana de HMGB1 podría ser explicada por la necrosis pancreática asociada al inicio de la pancreatitis. Además de su conocido efecto de mediador tardío en sepsis, esta citocina puede ser crítica en otras causas de SIRS tales como traumatismo severo, quemaduras y pancreatitis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akira S, Takeda,K, Kaisho,T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2001;2:675-680.
2. Delves PJ, Roitt,IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.
3. Delves PJ, Roitt,IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
4. Medzhitov R, Janeway,C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-344.
5. Levi M, ten Cate,H, van der,PT. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med* 2002;30:S220-S224.
6. Janeway CA, Jr., Medzhitov,R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
7. Underhill DM. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 2003;33:1767-1775.
8. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:5-11.
9. Medzhitov R, Janeway,C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000;8:452-456.
10. Medzhitov R, Janeway,CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296:298-300.
11. Hayashi F, Smith,KD, Ozinsky,A, Hawn,TR, Yi,EC, Goodlett,DR, Eng,JK, Akira,S, Underhill,DM, Aderem,A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-1103.
12. Wagner H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:62-69.
13. Cavailon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2001;47:695-702.

14. Cavailion JM. Pathophysiological role of pro- and anti-inflammatory cytokines in sepsis. *Sepsis* 1998;2:127-140.
15. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-1128.
16. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125:680-687.
17. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
18. Giroir BP. Pancreatitis, cytokines, and SIRS: deja vu all over again? *Crit Care Med* 1999;27:680-681.
19. Adib-Conquy M, Asehnoune, K, Moine, P, Cavailion, JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001;70:30-38.
20. Angus DC, Linde-Zwirble, WT, Lidicker, J, Clermont, G, Carcillo, J, Pinsky, MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
21. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-469.
22. Zhang G, Ghosh, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001;107:13-19.
23. Abraham E. NF-kappaB activation. *Crit Care Med* 2000;28:N100-N104.
24. Reinhart K, Bayer, O, Brunkhorst, F, Meisner, M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:S302-S312.
25. Huber-Lang M, Sarma, VJ, Lu, KT, McGuire, SR, Padgaonkar, VA, Guo, RF, Younkin, EM, Kunkel, RG, Ding, J, Erickson, R, Curnutte, JT, Ward, PA. Role of C5a in

- multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 2001;166:1193-1199.
26. Riedemann NC, Guo,RF, Ward,PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-524.
  27. Riedemann NC, Guo,RF, Ward,PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003;112:460-467.
  28. Karima R, Matsumoto,S, Higashi,H, Matsushima,K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999;5:123-132.
  29. Warren HS, Suffredini,AF, Eichacker,PQ, Munford,RS. Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med* 2002;347:1027-1030.
  30. Weiss M, Moldawer,LL, Schneider,EM. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* 1999;93:425-439.
  31. Bone RC, Grodzin,CJ, Balk,RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112:235-243.
  32. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 1999;25:556-566.
  33. Volk H, Hoflich,C, Grütz,G, Docke,W, Reinke,P. Pathophysiology of immunodepression in ICU patients. In: Vincent JL, Carlet J, Opal SM, eds. *The sepsis textbook*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002:197-210.
  34. Wolk K, Docke,W, von,B, V, Volk,H, Sabat,R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology* 1999;67:253-256.
  35. Hensler T, Hecker,H, Heeg,K, Heidecke,CD, Bartels,H, Barthlen,W, Wagner,H, Siewert,JR, Holzmann,B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997;65:2283-2291.
  36. Docke WD, Randow,F, Syrbe,U, Krausch,D, Asadullah,K, Reinke,P, Volk,HD, Kox,W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3:678-681.

37. Volk HD, Reinke,P, Krausch,D, Zuckermann,H, Asadullah,K, Muller,JM, Docke,WD, Kox,WJ. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Med 1996;22 Suppl 4:S474-S481.
38. Randow F, Syrbe,U, Meisel,C, Krausch,D, Zuckermann,H, Platzer,C, Volk,HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. J Exp Med 1995;181:1887-1892.
39. Kox WJ, Bone,RC, Krausch,D, Docke,WD, Kox,SN, Wauer,H, Egerer,K, Querner,S, Asadullah,K, von Baehr,R, Volk,HD. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. Arch Intern Med 1997;157:389-393.
40. Steinberg W, Tenner,S. Acute pancreatitis. N Engl J Med 1994;330:1198-1210.
41. Mergener K, Baillie,J. Acute pancreatitis. BMJ 1998;316:44-48.
42. Karne S, Gorelick,FS. Etiopathogenesis of acute pancreatitis. Surg Clin North Am 1999;79:699-710.
43. Bank S, Indaram,A. Causes of acute and recurrent pancreatitis. Clinical considerations and clues to diagnosis. Gastroenterol Clin North Am 1999;28:571-89, viii.
44. Bradley EL, III. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. Arch Surg 1993;128:586-590.
45. Wilson PG, Manji,M, Neoptolemos,JP. Acute pancreatitis as a model of sepsis. J Antimicrob Chemother 1998;41 Suppl A:51-63.
46. Frossard JL, Morel,P, Pastor,CM. Why clinical trials might succeed in acute pancreatitis when they failed in septic shock. JOP 2003;4:11-16.
47. Bruno MJ. Current insights into the pathogenesis of acute and chronic pancreatitis. Scand J Gastroenterol Suppl 2001;103-108.

48. Norman JG. New approaches to acute pancreatitis: role of inflammatory mediators. *Digestion* 1999;60 Suppl 1:57-60.
49. Widdison AL, Cunningham S. Immune function early in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996;83:633-636.
50. Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* 1995;130:966-970.
51. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998;175:76-83.
52. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 2003;326:262-266.
53. Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Crit Care Med* 2003;31:S46-S50.
54. Czura CJ, Yang H, Tracey KJ. High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor. *J Infect Dis* 2003;187 Suppl 2:S391-S396.
55. Wolffe AP. Architectural regulations and Hmg1. *Nat Genet* 1999;22:215-217.
56. Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 1994;10:94-100.
57. Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMGl. *Science* 1989;243:1056-1059.
58. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1768-1773.
59. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-251.
60. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain

- (amphoterin) involved in neurite outgrowth. *Journal of biological chemistry* 1991;266:16722-16729.
61. Ombrellino M, Wang,H, Ajemian,MS, Talhouk,A, Scher,LA, Friedman,SG, Tracey,KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 1999;354:1446-1447.
  62. Wang H, Vishnubhakat, JM, Bloom, O, Zhang, M, Ombrellino, M, Sama, A, Tracey, KJ. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery* 1999;126:389-392.
  63. Fiuza C, Bustin, M, Talwar, S, Tropea, M, Gerstenberger, E, Shelhamer, JH, Suffredini, AF. Inflammatory promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2002.
  64. Sappington PL, Yang, R, Yang, H, Tracey, KJ, Delude, RL, Fink, MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002;123:790-802.
  65. Dinarello CA, Gelfand, JA, Wolff, SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 1993;269:1829-1835.
  66. Brivet FG, Emilie, D, Galanaud, P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. *Crit Care Med* 1999;27:749-755.
  67. Bhatia M, Brady, M, Shokuhi, S, Christmas, S, Neoptolemos, JP, Slavin, J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000;190:117-125.
  68. Dominguez-Munoz JE, Carballo, F, Garcia, MJ, Miguel, dD, Gea, F, Yanguela, J, de la, MJ. Monitoring of serum proteinase--antiproteinase balance and systemic inflammatory response in prognostic evaluation of acute pancreatitis. Results of a prospective multicenter study. *Dig Dis Sci* 1993;38:507-513.
  69. Baumann H, Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.

70. Steel DM, Whitehead, AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994;15:81-88.
71. Gabay C, Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
72. Pezzilli R, Billi, P, Miniero, R, Fiocchi, M, Cappelletti, O, Morselli-Labate, AM, Barakat, B, Sprovieri, G, Miglioli, M. Serum interleukin-6, interleukin-8, and beta 2-microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with serum C-reactive protein. *Dig Dis Sci* 1995;40:2341-2348.
73. Heresbach D, Letourneur, JP, Bahon, I, Pagenault, M, Guillou, YM, Dyard, F, Fauchet, R, Malledant, Y, Bretagne, JF, Gosselin, M. Value of early blood Th-1 cytokine determination in predicting severity of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:554-560.
74. de Beaux AC, Goldie, AS, Ross, JA, Carter, DC, Fearon, KC. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996;83:349-353.
75. Leser HG, Gross, V, Scheibenbogen, C, Heinisch, A, Salm, R, Lausen, M, Ruckauer, K, Andreesen, R, Farthmann, EH, Scholmerich, J. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991;101:782-785.
76. Moore KW, de Waal, MR, Coffman, RL, O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
77. Wereszczynska-Siemiakowska U, Dabrowski, A, Siemiakowski, A, Mroczko, B, Laszewicz, W, Gabryelewicz, A. Serum profiles of E-selectin, interleukin-10, and interleukin-6 and oxidative stress parameters in patients with acute pancreatitis and nonpancreatic acute abdominal pain. *Pancreas* 2003;26:144-152.
78. Pezzilli R, Billi, P, Miniero, R, Barakat, B. Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997;42:1469-1472.

79. Berney T, Gasche,Y, Robert,J, Jenny,A, Mensi,N, Grau,G, Vermeulen,B, Morel,P. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:371-377.
80. Chen CC, Wang,SS, Lu,RH, Chang,FY, Lee,SD. Serum interleukin 10 and interleukin 11 in patients with acute pancreatitis. *Gut* 1999;45:895-899.
81. Deviere J, Le Moine,O, Van Laethem,JL, Eisendrath,P, Ghilain,A, Severs,N, Cohard,M. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography.
82. Kusske AM, Rongione,AJ, Ashley,SW, McFadden,DW, Reber,HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996;120:284-288.
83. Gumperz JE. CD1d-restricted "NKT" cells and myeloid IL-12 production: an immunological crossroads leading to promotion or suppression of effective anti-tumor immune responses? *J Leukoc Biol* 2004;76:307-313.
84. Uehara S, Gothoh,K, Handa,H, Tomita,H, Tomita,Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:363-370.
85. Pezzilli R, Miniero,R, Cappelletti,O, Barakat,B. Behavior of serum interleukin 12 in human acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:247-251.
86. Carson WE, Yu,H, Dierksheide,J, Pfeffer,K, Bouchard,P, Clark,R, Durbin,J, Baldwin,AS, Peschon,J, Johnson,PR, Ku,G, Baumann,H, Caligiuri,MA. A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells. *J Immunol* 1999;162:4943-4951.
87. Gibbons RA, Martinez,OM, Lim,RC, Horn,JK, Garovoy,MR. Reduction in HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP expression by Leu-M3+ cells from the peripheral blood of patients with thermal injury. *Clin Exp Immunol* 1989;75:371-375.
88. Livingston DH, Appel,SH, Wellhausen,SR, Sonnenfeld,G, Polk,HC, Jr. Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch Surg* 1988;123:1309-1312.

89. Volk HD, Reinke,P, Docke,WD. Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When to assess? *Eur J Surg Suppl* 1999;70-72.
90. Bhatnagar A, Wig,JD, Majumdar,S. Expression of activation, adhesion molecules and intracellular cytokines in acute pancreatitis. *Immunol Lett* 2001;77:133-141.
91. Kylanpaa-Back ML, Takala,A, Kempainen,E, Puolakkainen,P, Kautiainen,H, Jansson,SE, Haapiainen,R, Repo,H. Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1100-1107.
92. Richter A, Nebe,T, Wendl,K, Schuster,K, Klaebisch,G, Quintel,M, Lorenz,D, Post,S, Trede,M. HLA-DR expression in acute pancreatitis. *Eur J Surg* 1999;165:947-951.
93. Gotzinger P, Sautner,T, Spittler,A, Barlan,M, Wamser,P, Roth,E, Jakesz,R, Fugger,R. Severe acute pancreatitis causes alterations in HLA-DR and CD14 expression on peripheral blood monocytes independently of surgical treatment. *Eur J Surg* 2000;166:628-632.
94. Koppelman B, Neefjes,JJ, de Vries,JE, de Waal,MR. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 1997;7:861-871.
95. Monneret G, Finck,ME, Venet,F, Debard,AL, Bohe,J, Bienvenu,J, Lepape,A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004;95:193-198.
96. Woiciechowsky C, Schoning,B, Lanksch,WR, Volk,HD, Docke,WD. Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *J Mol Med* 1999;77:769-780.
97. Asadullah K, Woiciechowsky,C, Docke,WD, Egerer,K, Kox,WJ, Vogel,S, Sterry,W, Volk,HD. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection--immunomonitoring for patients after neurosurgery and

patients during high dose steroid therapy. Eur J Emerg Med 1995;2:184-190.

98. Eubanks JW, III, Sabek, O, Kotb, M, Gaber, LW, Henry, J, Hijjiya, N, Britt, LG, Gaber, AO, Goyert, SM. Acute pancreatitis induces cytokine production in endotoxin-resistant mice. Ann Surg 1998;227:904-911.
99. Ogawa M. Acute pancreatitis and cytokines: "second attack" by septic complication leads to organ failure. Pancreas 1998;16:312-315.
100. Schmid SW, Uhl, W, Friess, H, Malfertheiner, P, Buchler, MW. The role of infection in acute pancreatitis. Gut 1999;45:311-316.
101. Harter L, Mica, L, Stocker, R, Trentz, O, Keel, M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. Shock 2004;22:403-409.
102. O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. Trends Immunol 2004;25:687-693.
103. Tsujimoto H, Ono, S, Majima, T, Kawarabayashi, N, Takayama, E, Kinoshita, M, Seki, S, Hiraide, H, Moldawer, LL, Mochizuki, H. NEUTROPHIL ELASTASE, MIP-2, AND TLR-4 EXPRESSION DURING HUMAN AND EXPERIMENTAL SEPSIS. Shock 2005;23:39-44.
104. Johnson GB, Brunn, GJ, Platt, JL. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. J Immunol 2004;172:20-24.
105. Okamura Y, Watari, M, Jerud, ES, Young, DW, Ishizaka, ST, Rose, J, Chow, JC, Strauss, JF, III. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem 2001;276:10229-10233.
106. Zhang H, Patel, SA, Kandil, E, Mueller, CM, Lin, YY, Zenilman, ME. Pancreatic elastase is proven to be a mannose-binding protein--implications for the systemic response to pancreatitis. Surgery 2003;133:678-688.
107. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science 2002;296:301-305.
108. Demarco RA, Fink, MP, Lotze, MT. Monocytes promote natural killer cell interferon gamma production in response to

the endogenous danger signal HMGB1. *Mol Immunol* 2005;42:433-444.

109. Kokkola R, Andersson,A, Mullins,G, Ostberg,T, Treutiger,CJ, Arnold,B, Nawroth,P, Andersson,U, Harris,RA, Harris,HE. RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages. *Scand J Immunol* 2005;61:1-9.
110. Park JS, Svetkauskaite,D, He,Q, Kim,JY, Strassheim,D, Ishizaka,A, Abraham,E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004;279:7370-7377.