



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud
Programa de doctorado en Biomedicina

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE FACTORES INMUNOLOGICOS Y GENETICOS

EN EL CURSO DE LA PANCREATITIS AGUDA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Antonio Rodríguez Nicolas

Directores

Dr. Francisco Ruiz Cabello

Dr. Eduardo Redondo Cerezo

GRANADA, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Antonio Rodríguez Nicolás
ISBN: 978-84-1306-362-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/57977>

“Uno no se da cuenta de lo que ha hecho, sólo puede ver lo que queda por hacer”.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Muchísimas gracias a todas aquellas personas que han hecho que posible esta tesis.

A mis directores de tesis, los doctores Francisco Ruiz-Cabello Osuna y Eduardo Redondo Cerezo, gracias, porque sin vuestra oportunidad, sin vuestras ideas, dedicación, motivación, criterio y aliento no hubiera podido haber realizado esta tesis. Ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda.

Un agradecimiento especial a mis profesores y compañeros de la Universidad de Granada, que me transmitieron su interés por la investigación y su entusiasmo por la biología.

A los pacientes de este estudio que generosamente han donado sus muestras, ya que sin ellos no hubiera sido posible esta investigación.

Al Dr. Federico Garrido por permitirme llevar a cabo este trabajo durante los años de formación como residente y por haber favorecido el desarrollo de la investigación biomédica en la unidad de Análisis Clínicos e Inmunología..

A mis compañeros del servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del hospital Virgen de las Nieves, facultativos, técnicos y residentes, de todos he aprendido algo. A Miguel Ángel López Nevot y Antonio Garrido por acogerme en el laboratorio de HLA, por lo mucho que me enseñaron y por su calidad humana. A Pilar Jiménez y, de nuevo, Francisco Ruiz-Cabello, por enseñarme los secretos de la citometría de flujo y por ser un ejemplo a seguir profesional y personalmente. A Laura Jáimez por acogerme como a uno más en su laboratorio, por haberme ayudado a crecer profesionalmente, y por ser una gran persona. A Mónica Bernal, Teresa Rodríguez, Kiko Mora, Matías, y el resto de profesionales que me ayudaron

a crecer como inmunólogo. Nombrar a todos sería muy extenso y es posible que haya cometido algún olvido injusto, gracias a todos.

Gracias a mis residentes, grandes y pequeños; Alba, Carlos, Nerea, Paola, Cristina y Laura, por todos los momentos que hemos pasado. Un agradecimiento muy especial para Alba, por su apoyo y colaboración para que este trabajo fuera posible.

Esta investigación ha sido posible gracias al instituto de Salud Carlos III (PI11/01386, PI16/00752, RETIC RD 06/020, RD09/0076/00165), a la Unión Europea (FEDER, Fondo Europeo de Desarrollo Regional), y a la Junta de Andalucía (CTS-143).

Por último, un agradecimiento muy especial a mis padres por su apoyo incondicional y por ser ejemplo de constancia, trabajo y esfuerzo, y a mi hermana Natalia por todo el aliento recibido durante años. Gracias por siempre estar ahí.

ÍNDICE

CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	13
ANATOMIA DEL PANCREAS.....	15
PANCREATITIS AGUDA.....	20
DIAGNÓSTICO Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	20
EPIDEMIOLOGIA.....	24
MORTALIDAD Y MORBILIDAD	25
ETIOLOGÍA	25
<i>Cálculos biliares</i>	26
<i>Alcohol</i>	27
<i>Idiopática</i>	28
<i>Hiperlipidemia</i>	28
<i>Fármacos</i>	28
<i>Mutaciones genéticas</i>	29
FISIOPATOLOGÍA.....	30
CLASIFICACIÓN.....	36
TRATAMIENTO	40

ÍNDICE

MARCADORES DE GRAVEDAD EN PANCREATITIS AGUDA.....	43
MARCADORES DE LABORATORIO	46
MARCADORES DE MUERTE CELULAR.....	50
FACTORES INMUNOLÓGICOS DE LA INFLAMACION EN PANCREATITIS AGUDA	50
Células de la inmunidad innata en la inflamación	53
Inducción de la respuesta inmunitaria	60
Receptores de reconocimiento de patrones.....	60
Citoquinas.....	73
Células de la inmunidad adaptativa en la inflamación	83
Respuesta inflamatoria sistémica	88
Respuesta antiinflamatoria compensatoria	90
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	93
MATERIAL Y METODOS	97
EXTRACCIÓN DE ADN Y CUANTIFICACIÓN	103
GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS	105
POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs).....	105
MICROSATÉLITE DE NKKB1.....	109
ANÁLISIS DE CITOQUINAS EN SUERO	110
ANÁLISIS ESTADISTICO.....	111

ASPECTOS ÉTICOS.....	114
RESULTADOS.....	115
CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO	117
Características clínicas del total de los pacientes incluidos en el estudio	117
ESTUDIO DE CITOQUINAS EN SUERO	122
Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas.	123
Comparación de los niveles de citoquinas entre controles sanos y pacientes con pancreatitis aguda (PA).....	129
Comparación de los niveles de citoquinas entre pacientes con Pancreatitis Aguda	129
Comparación de los niveles de citoquinas con determinadas características clínicas o analíticas.....	132
Relación de los niveles de citoquinas en suero con otros parámetros	137
Análisis de curvas ROC.....	140
Ratio IL13/IFN- γ	147
ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN GENES IMPLICADOS EN LA INFLAMACION	149
Análisis de susceptibilidad a padecer la enfermedad.....	150
Análisis de la influencia de las variables genéticas en la gravedad de la PA ..	153
Asociación de polimorfismos con etiología de la pancreatitis.....	160
Análisis de la influencia de las variables genéticas en los niveles de citoquinas en suero	161

ÍNDICE

DISCUSION.....	163
DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE.....	165
CITOQUINAS EN LA PANCREATITIS AGUDA.....	167
Comparación de los niveles de citoquinas entre controles sanos y pacientes con pancreatitis aguda (PA).....	168
Análisis de curvas ROC y Ratio IL13/IFN γ	178
POLIMORFISMOS GENETICOS EN PANCREATITIS AGUDA.....	179
INFLUENCIA DE LAS VARIABLES GENÉTICAS EN LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN SUERO.....	186
CONSIDERACIONES FINALES.....	190
CONCLUSIONES.....	193
BIBLIOGRAFÍA.....	197
ANEXO.....	227
TH1 AND TH2 CYTOKINE PROFILES AS PREDICTORS OF SEVERITY IN ACUTE PANCREATITIS.....	229
ASSOCIATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS OF INFLAMMATORY RESPONSE GENES AND ACUTE PANCREATITIS.....	255

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico (DNA: *Deoxyribonucleic acid*)

AUC. Acrónimo del inglés *Area Under the Curve*.

CARS: Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (de inglés *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*).

CCK: colecistocinina.

CCL: Siglas en ingles de *Chemokine (C-C motif) ligand*.

CD: Células dendríticas

CPA: Célula presentadora de antígenos

CPRE Colangio-pancreatografía retrógrada endoscópica

DAMPs: Patrones moleculares asociados a peligro (del inglés *Danger-associated molecular patterns*).

Del: Delección

FMO: Fallo multiorgánico

FO: Fallo orgánico.

IC: Intervalo de confianza.

Ins: inserción

IFN: Interferón.

ABREVIATURAS

IL: Interleuquina.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg (del inglés *Hardy-Weinberg Equilibrium*).

LPS. Lipopolisacárido.

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (del inglés *Monocyte chemoattractant protein-1*).

MMS: Puntuación modificada de Marshall (del inglés *Modified Marshall Score*).

NOD2: siglas en inglés de *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*

NS: No significativo

OR: Odds ratio

PA: Pancreatitis Aguda

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen associated molecular patterns*).

pb: Pares de bases (*base pairs*)

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones.

rs: Número de referencia del SNP (del inglés *Reference SNP Number*)

RT-PCR: PCR a tiempo real (del inglés *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

RANTES: *Regulated upon activation, Normal T cell expressed and secreted*. También llamada CCL5.

ROC (curva): Característica Operativa del Receptor (del inglés *Receiver Operating Characteristic*).

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (del inglés *Systemic inflammatory response syndrome*).

SNP Polimorfismo de un sólo nucleótido (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*).

TNF- α Factor de necrosis tumoral α (del inglés *Tumoral necrosis factor α*).

RESUMEN

RESUMEN

La Pancreatitis Aguda (PA) es un proceso inflamatorio agudo de la glándula pancreática, que puede involucrar de forma variable a otros tejidos peripancreáticos o a otros órganos distantes.

Se trata de una enfermedad digestiva común, con una incidencia que se estima entre los 4,9 y los 35 casos por 100.000 habitantes. En el 80% de los pacientes la enfermedad sigue un curso benigno y se resuelve sin una gran morbilidad, pero en hasta un 20%, esta condición se complica con una morbilidad y mortalidad sustanciales. Entre estos casos graves, del 15% al 20% de los pacientes muere debido a complicaciones asociadas. La elevada morbilidad y mortalidad asociada con PA grave hace que la predicción temprana de un mal pronóstico sea de gran importancia.

Hay varios factores ambientales que han sido reconocidos como factores precipitantes de la Pancreatitis Aguda, entre los que se encuentran los cálculos biliares, el consumo excesivo de alcohol y comer en exceso. Sin embargo, no todos los sujetos con similares factores de riesgo desarrollan pancreatitis aguda, lo que sugiere que las variaciones genéticas individuales juegan un papel importante.

En el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una complicación potencialmente letal en la PA grave, tiene un papel importante la liberación excesiva de mediadores proinflamatorios, como citoquinas. La susceptibilidad a PA se ha asociado con variantes genéticas en la serina-proteasa 1 (PRSS1), la serina-proteasa 2 (PRSS2), el inhibidor de serina peptidasa tipo Kazal 1 (SPINK1) y el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

RESUMEN

Con estos antecedentes establecimos la hipótesis de trabajo de que las citoquinas debían jugar un papel esencial y podrían explicar las diferencias observadas en el curso clínico de la pancreatitis aguda. Por otra parte, se pretendía explorar la relación de las variaciones genéticas en los genes relacionados con el proceso inflamatorio con la susceptibilidad y gravedad de la Pancreatitis aguda con el objetivo de identificar un marcador pronóstico útil.

Se fijó como objetivo estudiar los niveles de citoquinas en suero en el momento del ingreso en una serie de pacientes con pancreatitis aguda del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada como herramienta para proporcionar información que sirva para predecir el curso de la enfermedad, además de la determinación de polimorfismos genéticos de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, y su relación con los niveles de producción de citoquinas, y parámetros clínicos de la enfermedad

El estudio analítico de citoquinas en suero se realizó en 117 pacientes (51 hombres y 66 mujeres) mediante la realización de inmunoensayos multiplex. Fueron 12 las citoquinas analizadas, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13, IL18, GMCSF, IFN γ y TNF α .

Se estudiaron los siguientes polimorfismos en 269 pacientes *IL23R* rs11209026, *TNF* rs1800629, *RIPK2* rs42490, *NOD2* rs9302752, *MCP1* rs1024611 y *NFKB1* rs28362491. A partir de muestras de sangre periférica se extrajo ADN genómico que se empleó para el genotipado. Todos los genes a excepción de *NFKB1* se analizaron mediante el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) gracias a la realización de PCR a tiempo real empleando sondas TaqMan®.

Además, en el gen *NFKB1* se estudió un polimorfismo de inserción / deleción situado en la región promotora del gen que se encuentra en la posición -94 mediante análisis de microsatélites por electroforesis capilar. El análisis estadístico realizado incluyó un estudio caso control para cada uno de los polimorfismos, estudio de asociación con el fenotipo dentro de cada grupo de pacientes y de las relaciones epistáticas entre los distintos genes.

Los resultados obtenidos, confirman la alteración de los niveles de citoquinas séricas en pancreatitis aguda. Se constató que coexisten en estos pacientes dos perfiles de citoquinas diferenciados, y que dicho perfil tiene un impacto en el pronóstico de la enfermedad. Se identificó un perfil con predominio de citoquinas proinflamatorias y otro distinto en el que predominan las citoquinas TH2. Así, niveles altos de las citoquinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL18, IL10, IL5 e IL6 se encuentran asociados a PA grave o moderadamente grave, con un mayor riesgo de fallecimiento, y con una mayor duración del ingreso hospitalario. Por el contrario, niveles elevados de GM-CSF, IL1 β , IL4 e IL13 están asociados a una menor gravedad.

Del análisis de polimorfismos se concluye que el alelo *IL23R rs11209026-A* está asociado con un mayor riesgo de desarrollar PA. El aumento de la incidencia de PA puede ser explicado por una respuesta TH17 deficiente. Este defecto podría provocar una reducción en los niveles de producción de citoquinas TH17 y por tanto una disminución del efecto barrera favoreciendo la translocación de organismos microbianos en la mucosa intestinal. Por otro lado, el alelo *RIPK2 rs42490-G* se asocia con una mayor gravedad de la PA, además de con mayor

RESUMEN

mortalidad, lo que puede estar relacionado con el aumento que induce esta variante en los niveles séricos de IFN γ .

En resumen, de nuestro estudio se puede deducir que presentar un perfil de citoquinas asociado a baja respuesta inflamatoria y/o perfil TH2 está asociado a una evolución clínica favorable de la pancreatitis aguda. En este sentido proponemos una ratio IL13/IFN γ como un biomarcador para la predicción de enfermedad grave en las primeras 24 horas tras el ingreso hospitalario. Del estudio genético realizado se concluye que el alelo IL23R rs11209026-A está asociado con un mayor riesgo de desarrollar PA, lo que pensamos que podría ser debido a una respuesta TH17 deficiente lo que favorecería una disminución del efecto barrera en la mucosa intestinal. Además, el alelo *RIPK2* rs42490-G, relacionado con un aumento de los niveles séricos de IFN γ , se asocia con una mayor gravedad de la PA. Como conclusión final, un perfil genético o serológico asociado a respuesta inflamatoria moderada está asociado a evolución favorable de la pancreatitis aguda, pudiendo constituir biomarcadores para la estratificación del riesgo en dicha enfermedad.

INTRODUCCION

ANATOMIA DEL PANCREAS

El páncreas, del griego πάγκρεας "todo carne" [1], es una glándula mixta exocrina y endocrina, que produce enzimas digestivas y hormonas. Se encuentra situado en el retroperineo, extendiéndose a lo largo de la pared posterior del abdomen, desde el duodeno, por la derecha, al hilio del bazo, en la izquierda, a nivel de las vértebras lumbares segunda y tercera [2-4].

El páncreas mide unos 16-20 cm de largo, y unos 3-4 cm de ancho, con un peso que oscila entre 40 y 120 g. Se trata de un órgano en forma de cuña de 1-2 cm de grosor, que se encuentra rodeado por una delgada capa de tejido conjuntivo. Tabiques de tejido conjuntivo dividen al páncreas en lobulillos, de los cuales los más grandes son visibles macroscópicamente [2, 5].

El páncreas está formado por varias secciones: la cabeza, el proceso unciforme, el cuello, el cuerpo y la cola de páncreas.

- La cabeza del páncreas se encuentra rodeada por el duodeno, con el proceso unciforme situado de forma posterior a los vasos mesentéricos superiores.
- El cuello del páncreas es anterior a los vasos mesentéricos superiores
- El cuerpo del páncreas, de forma alargada, se encuentra a la altura de la primera a segunda vértebra lumbar. Se extiende desde el cuello hasta la cola del páncreas, por encima de la flexura duodenoyeyunal y cruza la parte superior del riñón izquierdo.

- La cola del páncreas termina en el hilio del bazo, en el ligamento esplenorrenal [3, 6]:

El conducto pancreático, de aproximadamente 2 milímetros de diámetro, se origina en la cola del páncreas. Se dirige hacia la cabeza, donde se une al conducto biliar común. La unión de estas dos estructuras forma la ampolla hepatopancreática, (ampolla de Vater), en la papila mayor del duodeno. El esfínter de Oddi regula la secreción hepatopancreática [3, 6].

El conducto pancreático accesorio drena en el duodeno inmediatamente por encima de la papila mayor en la papila menor del duodeno. Los conductos pancreáticos principal y accesorio se encuentran habitualmente comunicados [3].

El páncreas es una glándula mixta, exocrina y endocrina. Como glándula exocrina produce enzimas digestivas, y como glándula endocrina hormonas.

La porción exocrina constituye la mayor parte del tejido pancreático, un 98% del peso. Es capaz de sintetizar cada día hasta 2 L de jugo pancreático [2]. El páncreas exocrino se encuentra organizado como una glándula tubuloacinar compuesta. Está formada por varios miles de lobulillos ensamblados, con un diámetro de aproximadamente tres milímetros. Cada lobulillo contiene a su vez varios conductos glandulares (acini) rodeados por células secretoras. Las enzimas digestivas formadas por estas células glandulares son liberadas en un proceso de secreción merocrina, formando una secreción acuosa [7]. Los acinos están rodeados por una membrana basal soportada por una fina red de fibras reticulares. Las células secretoras de cada acino rodean un pequeño conducto intercalado. Los conductos intercalados drenan en conductos más grandes dentro del lóbulo, y

finalmente en conductos interlobulares. Los conductos están revestidos por una única capa de epitelio columnar [7].

La porción endocrina se compone de las células de los islotes de Langerhans que producen, por ejemplo, las hormonas insulina y glucagón, de importancia fundamental sobre el metabolismo de los hidratos de carbono [2, 5]. Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo. En conjunto, el total de islotes representan alrededor del 1% en peso de la glándula, cerca de 1 g [2].

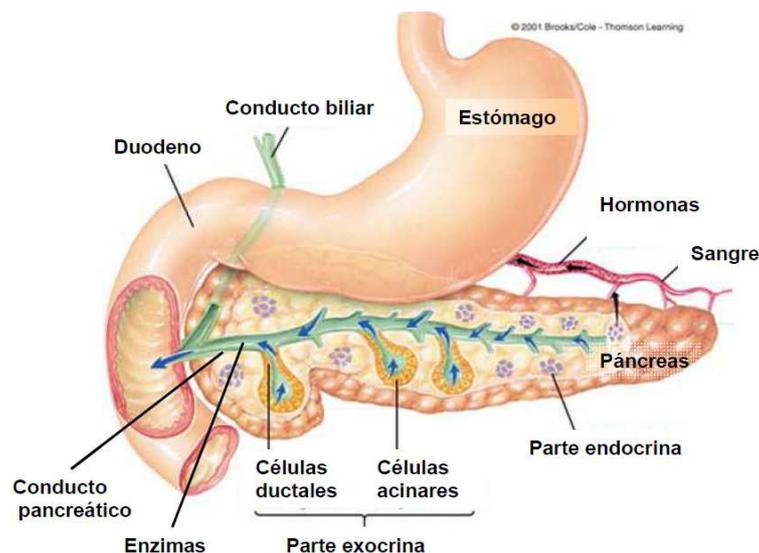


Figura 1: Histología y funciones del páncreas en condiciones normales. Modificado de Fuente: Brooks/Cole - Thomson Learning, 2001

El páncreas es la principal glándula exocrina. Secreta, además de agua, bicarbonato sódico y otros electrolitos; diversas proteinasas (tripsinógenos 1, 2 y 3; quimiotripsinógeno; proelastasas 1 y 2; proteinasa E; calicreínógeno; procarboxipeptidasas A1, A2, B1, y B2), amilasa, lipasas (lipasa de triacilglicérols,

colipasa y carboxilesterasa) fosfolipasa A2 y nucleasas (ribonucleasa, desoxirribonucleasa).

La enzima enteropeptidasa, producida por las células de la mucosa duodenal, se encarga de la activación del tripsinógeno, mediante una escisión específica, dando así lugar a tripsina, que es la forma activa. A su vez, la tripsina a su vez activa a otras enzimas proteolíticas. La lipasa se activa a través de la proteína colipasa. La colipasa se segrega en forma de precursor, siendo activado por la tripsina [8]. El que la mayoría de enzimas se almacenen en la forma inactiva (proenzimas) en los gránulos de secreción de las células acinosas y se activen en la luz del intestino delgado después de la secreción es muy importante para la protección del páncreas contra la actividad de estas enzimas. Además, en el propio páncreas se elaboran inhibidores de tripsinas que proporcionan protección adicional.

La secreción pancreática exocrina se encuentra bajo un doble control nervioso y hormonal. El olor y el sabor de los alimentos, la masticación, y la distensión de la pared estomacal estimulan la producción de jugo pancreático mediante estimulación por el nervio vago [9]. En cuanto al control hormonal, las hormonas secretina, colecistoquinina y probablemente gastrina [10] actúan estimulando la formación y liberación de jugo pancreático [11, 12].

Tanto la estimulación vagal como la colecistoquinina inducen la secreción de enzimas pancreáticas en las células acinares [11]. La síntesis de colecistoquinina esta inducida por la presencia en la luz del intestino de ácidos grasos de cadena larga, algunos aminoácidos esenciales, y el pH bajo mientras que la presencia de ácido (pH<4.5) en la luz intestinal es un estímulo fuerte para la secreción de

secretina [11]. Esta hormona promueve una secreción líquida abundante, con escasa actividad enzimática y mucho bicarbonato [13]. Esta secreción alcalina, producida por las células de los conductos intercalares sirve para neutralizar la acidez del quimo, de modo que las enzimas pancreáticas puedan funcionar en su franja óptima de pH. La acción combinada de la secretina y la colecistocinina proporciona una secreción abundante de jugo pancreático alcalino, con gran abundancia de enzimas [11, 13].

Las hormonas somatostatina, glucagón, el polipéptido pancreático, el péptido YY, además de la estimulación del sistema nervioso simpático, inhiben la formación y liberación de jugo pancreático [10, 11].

Aproximadamente el 2% del peso del páncreas corresponde a los islotes de Langerhans, que conforman el tejido endocrino. Aparecen al microscopio óptico como grupos redondeados de células de coloración menos intensa incrustados en el tejido pancreático exocrino.

La mayor parte de los islotes miden entre 100 y 200 μm de diámetro, y están formados por centenares de células. Hay entre 0,5 y 2 millones de islotes, y son algo más abundantes en la cola del páncreas.

Los islotes se componen de células poliédricas, dispuestas en cordones, en torno a las cuales hay una red abundante de capilares sanguíneos con células endoteliales fenestradas. Una fina capa de tejido conjuntivo separa los islotes del tejido pancreático exocrino.

En los islotes se distinguen al menos cinco tipos celulares:

- Las células α producen glucagón (alrededor del 30% de las células de los islotes)
- Las células β producen insulina y amilina (alrededor del 60% de las células de los islotes)
- Las células δ producen somatostatina (alrededor del 5% de las células de los islotes)
- Las células PP producen un polipéptido pancreático (menos del 5% de las células de los islotes)
- Las células ϵ producen ghrelina.

PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda es un proceso inflamatorio agudo del páncreas, caracterizado clínicamente por dolor abdominal y niveles elevados de enzimas pancreáticas en sangre periférica.

DIAGNÓSTICO Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Atendiendo a la última versión de la clasificación de Atlanta, la pancreatitis aguda puede clasificarse en las siguientes tres categorías [14]:

Pancreatitis aguda leve. Se caracteriza por la ausencia de insuficiencia orgánica y complicaciones locales o sistémicas.

Pancreatitis aguda moderadamente grave. Se caracteriza por insuficiencia orgánica transitoria (se resuelve en 48 horas) y / o complicaciones locales o sistémicas sin insuficiencia orgánica persistente (> 48 horas).

Pancreatitis aguda grave. Se caracteriza por insuficiencia orgánica persistente que puede afectar uno o varios órganos.

Clínica

La mayoría de los pacientes con pancreatitis aguda debutan con dolor abdominal, localizado generalmente en el epigastrio, y que en aproximadamente el 50 por ciento de los casos, irradia hacia la parte posterior [15, 16]. En algunos pacientes, el dolor puede estar en el cuadrante superior derecho o, rara vez, limitado al lado izquierdo. A menudo se ve acompañada de vómitos, fiebre, taquicardia, leucocitosis y niveles elevados de enzimas pancreáticas en la sangre y / o la orina [16].

Aproximadamente el 90 por ciento de los pacientes presentan náuseas y vómitos asociados que pueden persistir durante varias horas [15].

Los pacientes con pancreatitis aguda grave pueden presentar disnea debido a derrames pleurales o síndrome de dificultad respiratoria aguda.

Hallazgos de laboratorio

Uno de los primeros eventos de la pancreatitis aguda, es la interrupción del acoplamiento síntesis-secreción de las enzimas digestivas pancreáticas. La secreción se encuentra bloqueada, pero la síntesis continúa [17], en consecuencia,

las enzimas salen al espacio intersticial y a continuación irrumpen en la circulación sistémica [17].

La activación de granulocitos y macrófagos en la pancreatitis aguda da como resultado la liberación de varias citoquinas y mediadores inflamatorios. La pancreatitis aguda se asocia con elevaciones de la proteína C reactiva (PCR), elastasa y varias interleuquinas. Un nivel de PCR por encima de 150 mg / dL a las 48 horas se asocia con pancreatitis grave.

Existen varios mediadores y marcadores inflamatorios que se asocian con gravedad en la pancreatitis aguda. En 1991 Lesser *et al.* observaron que existía una relación entre los niveles séricos de IL-6 y la gravedad en PA. Otros estudios realizados en los años sucesivos reportaron que la elevación de los niveles de IL-6, IL-8, IL-1, factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de necrosis tumoral (TNF), están elevados en los pacientes con pancreatitis aguda grave en comparación con aquellos con PA moderadamente grave [18-20].

Otro marcador que puede ser útil en la detección de pancreatitis aguda temprana y como un predictor de la gravedad de la PA es el péptido de activación del tripsinógeno (TAP), un péptido de cinco aminoácidos que se escinde del tripsinógeno para producir tripsina activa, y que se encuentra elevado en la PA [21-23].

Diagnóstico

El diagnóstico de pancreatitis aguda requiere dos de los siguientes tres hallazgos:

- 1) Dolor abdominal agudo.
- 2) Elevación de la amilasa sérica y / o lipasa por encima de 3 veces el límite superior de la normalidad
- 3) Hallazgos característicos de pancreatitis aguda en la tomografía computarizada o en ecografía abdominal.

Cabe destacar que, aunque la elevación de los niveles séricos de amilasa y / o lipasas respalda el diagnóstico de pancreatitis en un paciente con dolor abdominal intenso, no es exclusiva de esta patología, siendo posible hallar elevaciones moderadas de las enzimas pancreáticas en otros procesos. La elevación de la amilasa sérica por encima de tres veces el límite superior de la normalidad tiene una sensibilidad para el diagnóstico de pancreatitis aguda de entre el 67 al 83 por ciento y una especificidad del 85 al 98 por ciento [24]. El grado de elevación de las enzimas pancreáticas no se correlaciona con la gravedad de la pancreatitis y la normalización de los niveles enzimáticos no es necesariamente un signo de resolución. En presencia de pancreatitis, un aumento en los valores de las enzimas hepáticas, especialmente de alanina aminotransferasa a más de 3 veces el límite superior de la normalidad, sugiere una causa biliar. Una historia de niveles de triglicéridos superiores a 1000 mg / dL o la persistencia de niveles elevados de triglicéridos después de la resolución del ataque sugiere que la hipertrigliceridemia puede ser la causa de la pancreatitis. En el 20% de los

pacientes con pancreatitis de etiología alcohólica puede no observarse un aumento de amilasa, debido a su menor capacidad para producir dicho enzima; ni tampoco en el 50% de los pacientes con hipertrigliceridemia, debido a que los triglicéridos interfieren con el ensayo de la amilasa [25].

Por lo general, no es necesario medir tanto la amilasa sérica como la lipasa. La lipasa sérica puede ser preferible porque permanece normal en algunas afecciones no pancreáticas que aumentan la amilasa sérica, incluida la macroamilasemia, la parotiditis y algunos carcinomas. La lipasa sérica tiene una sensibilidad y especificidad para la pancreatitis aguda que oscila entre el 82 y el 100 por ciento [24]. El aumento de los niveles de lipasa sérica ocurre más temprano y dura más en comparación con la elevación de la amilasa, siendo especialmente útiles en pacientes que se presentan más de 24 horas después de la aparición de los síntomas [21]. La lipasa sérica también es más sensible que la amilasa en pacientes con pancreatitis con etiología alcohólica [21]. Tras el diagnóstico, la medición diaria de los niveles séricos de amilasa y lipasa sérica tienen un valor limitado para evaluar el progreso de la enfermedad y su pronóstico final. Si los niveles de amilasa y / o lipasa en suero permanecen elevados durante varias semanas, es posible que sea debido a inflamación pancreática o peripancreática persistente, a un bloqueo del conducto pancreático o al desarrollo de un pseudoquiste.

EPIDEMIOLOGIA

La pancreatitis aguda es una enfermedad inflamatoria digestiva, con una incidencia reportada entre 4.9-35 por 100.000 habitantes [26]. La incidencia de la pancreatitis aguda ha experimentado un aumento las últimas dos décadas. Entre

los años 1994 y 2001 la incidencia de PA en California aumento desde 33 hasta 43 casos por 100.000 habitantes [27]. Este aumento de la incidencia ha sido atribuido en parte a un repunte del consumo de alcohol y a la mejora de las capacidades diagnósticas [28]. Este aumento de la incidencia también ha sido constatado en Europa [29]. El curso de la enfermedad es habitualmente benigno, pero en un 20 % de los pacientes, la enfermedad tiene un curso grave, con un incremento sustancial de la morbilidad y la mortalidad. Entre esos casos graves, un 15-20% puede morir por complicaciones asociadas [30].

MORTALIDAD Y MORBILIDAD

Aproximadamente la mitad de las muertes se producen en el transcurso de dos semanas tras el inicio. La morbilidad y la mortalidad tempranas son atribuibles en muchos casos a un fallo orgánico secundario al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Las muertes restantes ocurren por las complicaciones posteriores a la necrosis. Aquellos pacientes supervivientes pueden tener insuficiencia pancreática exocrina o endocrina, especialmente si ha habido pérdida de una porción significativa del parénquima pancreático por cicatrización o resección. Otras complicaciones son la estenosis del conducto pancreático, o la aparición de pseudoquistes recurrentes.

ETIOLOGÍA

Son varios los factores ambientales que han sido reconocidos como factores precipitantes, de la pancreatitis aguda, siendo la migración de cálculos biliares y el abuso de alcohol las principales causas de la enfermedad, representando dos tercios o más de los casos en los Estados Unidos [31]. No obstante, la gravedad de

la enfermedad no parece guardar una relación directa con la etiología, y no todos los pacientes con factores de riesgo similares desarrollan pancreatitis.

Cálculos biliares

Los cálculos biliares y el abuso de alcohol son las causas más comunes de pancreatitis aguda y cada una de ellas explica la etiología subyacente en 30 a 50% de los casos [32, 33]. Aproximadamente el 50% de las mujeres y el 15% de los hombres tienen cálculos en la vesícula biliar, lo que explica por qué la etiología litiásica predomina en el sexo femenino[32], aunque de los pacientes con cálculos biliares, solamente del 3 al 7 por ciento desarrollan pancreatitis [34]. Los cálculos en la vesícula biliar o en el tracto biliar predisponen a la pancreatitis [32].

Mientras que el 75% de los portadores de cálculos en la vesícula biliar permanecen asintomáticos, el 8% de los pacientes con cálculos biliares finalmente desarrollarán pancreatitis aguda [32, 35], siendo con frecuencia, la pancreatitis aguda la primera manifestación de cálculos biliares [32]. La mayoría de los pacientes con pancreatitis aguda biliar se recuperan por completo después de un episodio de pancreatitis edematosa leve, pero el 15-30% desarrolla pancreatitis necrotizante severa, que requiere cuidados intensivos y estrategias de tratamiento multidisciplinario [32]. Los cálculos biliares desencadenan la pancreatitis aguda cuando se impactan en la papila duodenal y obstruyen el flujo de salida del conducto pancreático [36]. Esto conduce a un aumento de la presión pancreática, a veces solo de forma transitoria, pero induce una lesión celular acinar y desencadena la aparición de la enfermedad [32].

Alcohol

Junto a los cálculos biliares, el alcohol es el factor más común asociado con la pancreatitis aguda, estimándose que el consumo de alcohol es responsable de aproximadamente el 30 por ciento de los casos de pancreatitis aguda en los Estados Unidos [37]. Está bien establecido que el consumo excesivo de alcohol puede iniciar un episodio de pancreatitis aguda y aumentar la susceptibilidad a la pancreatitis crónica, sin embargo, solo una minoría de alcohólicos desarrolla pancreatitis aguda o crónica. Se estima que el 10 por ciento de los alcohólicos crónicos padecerá en algún momento pancreatitis aguda [38]. Esto implica que el consumo de alcohol por sí solo rara vez es el único factor desencadenante de la pancreatitis, sino que el alcohol sensibiliza al páncreas por cofactores como una dieta rica en lípidos o agentes infecciosos [32]. Sin embargo, no se la razón por la cual solo una pequeña proporción de alcohólicos desarrolla pancreatitis, ni tampoco los factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo de pancreatitis [39].

Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE)

Aproximadamente el 5 por ciento de los pacientes sometidos a CPRE terapéutica desarrollan pancreatitis aguda [40]. Hay múltiples factores relacionados con el operador, el paciente y el procedimiento que aumentan el riesgo de PA. Los factores más importantes incluyen la falta de experiencia del personal, disfunción del esfínter de Oddi, dificultad para la canulación y el desempeño de una CPRE terapéutica, paciente joven y el sexo femenino [40].

Idiopática

La pancreatitis idiopática es, tras los cálculos biliares y el alcohol, la tercera causa más común de pancreatitis aguda, independientemente del país, la región o la serie de casos. La pancreatitis idiopática aguda se define como PA con un factor etiológico no especificado. El diagnóstico de pancreatitis idiopática aguda debe tratar de minimizarse mediante la identificación de los factores etiológicos en función de los síntomas clínicos, así como las pruebas apropiadas [41].

Hiperlipidemia

Los niveles de triglicéridos en sangre de más de 1000-2000 mg / dl aumentan el riesgo de pancreatitis aguda [39]. La hiperlipidemia tipo V, así como los tipos I y IV, son importantes causas de PA. Puede existir hiperlipidemia secundaria, causada por ingesta excesiva de alcohol, embarazo, terapia de estrógenos o diabetes mellitus, todos los cuales son factores de riesgo para la PA [42].

No hay consenso acerca del cual riesgo de pancreatitis aguda asociada con hiperlipidemia, pero según algunos trabajos podría representar hasta el 4% de todos los casos de PA [43].

Fármacos

El diagnóstico de pancreatitis aguda inducida por medicamentos es poco frecuente (0.1 a 2%), aunque hay trabajos que apuntan a un aumento de la incidencia en los últimos años [32, 39, 44]. La tendencia hacia el envejecimiento de la población, y en consecuencia, el aumento de la población polimedicada, podría estar detrás de este aumento [32].

El mecanismo patológico es específico de fármaco, puede incluir espasmo del esfínter, reacciones de hipersensibilidad, angioedema localizado, trombosis arteriolar, efectos citotóxicos y metabólicos [32]. El diagnóstico es laborioso y se basa en descartar otras etiologías más comunes. Los fármacos comúnmente asociados con PA son las sulfonamidas, 6-mercaptopurina y aminosalicilatos (reacciones de hipersensibilidad); tetraciclina, pentamidina, ácido valproico (acumulación de metabolitos tóxicos); sulfonamidas, diuréticos (efecto tóxico directo); azatioprina, diuréticos (isquemia); anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal (hipertrigliceridemia, trombosis arteriolar local); esteroides y diuréticos (aumento de la viscosidad del jugo pancreático); enzima convertidora de angiotensina (angioedema localizado) y estatinas (toxicidad directa y de acumulación) [32, 45, 46].

Mutaciones genéticas

Se han identificado varias mutaciones genéticas asociadas con pancreatitis. Las mutaciones de ganancia de función en el gen de la serina proteasa 1 (*PRSS1*) en el cromosoma 7q35, que codifica el tripsinógeno catiónico, dan como resultado una forma heredada de forma dominante de pancreatitis hereditaria [47].

Las mutaciones en el gen de la fibrosis quística (*CFTR*) se han asociado con una pancreatitis autosómica recesiva heredada. La pancreatitis también se ha asociado con mutaciones de baja penetrancia en el inhibidor de la serina proteasa Kazal-tipo 1 (*SPINK1*), que puede actuar como un modificador de la enfermedad y reducir el umbral para desarrollar pancreatitis a partir de otros factores genéticos o ambientales [48]. Las mutaciones en el gen de la quimotripsina C (*CTRC*) también se han identificado en la pancreatitis aguda [49]

FISIOPATOLOGÍA

Se han desarrollado varios modelos animales para el estudio de la patogénesis de la pancreatitis aguda, pero ninguno es estrictamente comparable a la enfermedad humana [50, 51]. La mayoría de casos de pancreatitis aguda en humanos están causados por cálculos biliares o el abuso de alcohol, pero los modelos animales empleados no son análogos de estas situaciones [50]. Sin embargo, los cambios estructurales y bioquímicos que se observan en las primeras fases de la pancreatitis aguda son constantes en diferentes modelos animales, y dichos cambios también han sido observados en humanos. Además, la fisiopatología de la pancreatitis aguda humana parece ser independiente de la etiología.

Aunque hay varios factores que pueden inducir la pancreatitis aguda, solo una pequeña fracción de los pacientes con estos factores predisponentes desarrollan la enfermedad, tan solo del 3 a 7 por ciento de los pacientes con cálculos biliares [34], menos del 10 por ciento de los alcohólicos [52] y pocos pacientes con hipercalcemia [53].

En la pancreatitis inducida por alcohol no se conoce el mecanismo exacto por el que estos agentes inducen PA, ni la razón por la que se desencadena tan solo después de muchos años de consumo. Entre los mecanismos propuestos figuran los siguientes [54]:

- Sensibilización de las células acinares a la activación prematura de zimógenos [54]

- Aumento del efecto de la colecistoquinina en la activación de factores de transcripción [54].
- Generación de metabolitos tóxicos tales como acetaldehído y ésteres etílicos de ácidos grasos [54].
- Sensibilización del páncreas a los efectos tóxicos del virus coxsackie B3 [54].
- Activación de células estrelladas pancreáticas por acetaldehído y estrés oxidativo y posterior aumento de la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz [54].

Como ya se ha comentado los cálculos biliares desencadenan la pancreatitis aguda cuando se impactan en la papila duodenal y obstruyen el flujo de salida del conducto pancreático [36] lo que conduce a un aumento de la presión pancreática induciendo una lesión celular acinar y desencadenando la aparición de la enfermedad [32].

En la PA inducida por hiperlipidemia, se liberan ácidos grasos libres a partir de triglicéridos séricos hasta alcanzar concentraciones tóxicas, por la acción de la lipasa pancreática dentro de los capilares pancreáticos [55].

El páncreas exocrino sintetiza y secreta varias enzimas digestivas muy potentes, por lo que existen mecanismos protectores. La pancreatitis aguda se desencadena cuando se ven superados los mecanismos protectores para prevenir la activación prematura de estas enzimas digestivas.

Entre estos mecanismos figura la secreción de estas enzimas en forma de proenzimas inactivas, o zimógenos. Se pueden activar de forma espontánea pequeñas cantidades de tripsinógeno, pero el páncreas dispone de varios mecanismos de protección para librarse rápidamente de la tripsina activada:

La primera línea de defensa es la síntesis de inhibidores de tripsina específicos tales como el inhibidor de serin proteasa Kazal tipo 1 (SPINK1 o PSTI), que actúa combinándose con la molécula de tripsina, siendo capaz de neutralizar como máximo un 20% de dicha molécula [56].

La segunda línea de defensa es la autólisis de tripsina activada de forma prematura. Se ha postulado que la ausencia de este mecanismo puede ser causante de pancreatitis hereditaria [56].

La mesotripsina y la denominada enzima Y lisan e inactivan a la tripsina. Una labor parecida es llevada a cabo por algunas anti proteasas inespecíficas, como la alfa-1-antitripsina y la alfa-2-macroglobulina, situadas en el intersticio pancreático [56].

Otros mecanismos protectores son la compartimentación de enzimas y las bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular [56].

El acontecimiento patogénico central de la PA es la activación intraacinar de enzimas proteolíticas [15, 57].

Uno de los primeros eventos en diferentes modelos de pancreatitis aguda es el bloqueo de la secreción de enzimas pancreáticas mientras que la síntesis continúa. La activación intraacinar de estas enzimas proteolíticas, en última instancia conduce a una lesión autodigestiva de la glándula [56]. Un mecanismo propuesto

por el cual se produce la activación intraacinar y conduce a la destrucción del páncreas en modelos animales de pancreatitis es el siguiente [57]:

- Se generan grandes cantidades de tripsina activa dentro del páncreas. En una célula acinar normal, las enzimas lisosómicas, y las enzimas digestivas, son clasificadas por la red de Golgi, de manera que las enzimas digestivas como el tripsinógeno no se activen dentro de la célula. Sin embargo, en la pancreatitis, se produce la co-localización de vacuolas lisosómicas y de excreción en un proceso llamado crinofagia [58]; y la catepsina B lisosómica escinde el péptido de activación del tripsinógeno dentro de las células acinares [56].

- A continuación, las vacuolas se rompen, liberando la tripsina activa [56].

- Los mecanismos normales de defensa del páncreas se ven superados por las grandes cantidades de tripsina liberada. Además, la liberación intrapancreática de tripsina conduce a la activación en cascada de más tripsina y otras enzimas pancreáticas como la fosfolipasa, la quimotripsina y la elastasa. La tripsina también activa otras cascadas enzimáticas entre las que se encuentran las del complemento, calicreína-cinina, coagulación y fibrinólisis [56]. Se establece así un círculo vicioso de liberación de enzimas activas que dañan el tejido, causando a su vez la liberación de más enzimas.

En el modelo de pancreatitis experimental inducida por ceruleína, en ratas, la activación intrapancreática del tripsinógeno se produce a los 10 minutos de suministrar una dosis de ceruleína, un agente análogo de la colecistoquinina [59]. La activación del tripsinógeno ocurre antes de que se haga patente de las células acinares [56]. E-64d, un inhibidor específico de la catepsina B muy potente evita la

activación del tripsinógeno inducida por ceruleína [60]. Esta observación respalda la importancia de la catepsina B para la activación del tripsinógeno, y la importancia de la colocalización de las enzimas digestivas pancreáticas y las hidrolasas lisosomales [56].

Hay datos experimentales que sugieren que la vía de NF-KB se activa de forma muy temprana en la PA experimental, al mismo tiempo que la activación del tripsinógeno, pero de forma independiente. [61, 62]. La vía de NF- KB es clave en la expresión de un gran número de genes y en la posterior producción de citoquinas pro y antiinflamatorias, y su activación aumenta la gravedad de la PA experimental [63, 64].

La liberación de enzimas pancreáticas daña el endotelio vascular y el intersticio, así como las células acinares [65-67]. Los cambios en la microcirculación, como la vasoconstricción, la estasis capilar, la disminución de la saturación de oxígeno y la isquemia progresiva, se producen de manera temprana en modelos experimentales de pancreatitis aguda [54]. Estos cambios conducen a una mayor permeabilidad vascular y a edema. La lesión vascular puede provocar un fallo microcirculatorio local y la amplificación de la lesión pancreática.

También se especula sobre el papel de la lesión por isquemia-reperfusión en el páncreas [67]. Este mecanismo de lesión es bien conocido en otros órganos, como el corazón, los intestinos y el músculo esquelético. La reperfusión de tejidos dañados conduce a la liberación de radicales libres y citoquinas inflamatorias a la circulación sistémica, lo que puede causar otras complicaciones sistémicas.

Se han propuesto otros mecanismos, como la auto activación del tripsinógeno o la activación por otras proteasas lisosómicas. Otro mecanismo, ilustrado en la figura 2, propone que en evento inicial es el aumento de la concentración de calcio intracelular acompañada de una disminución del pH intracelular.

Los modelos animales muestran que desde fases iniciales hay una invasión del páncreas por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares [68-70]. La activación de granulocitos y macrófagos provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral, interleucinas 1, 6 y 8), metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, factor activador de plaquetas y leucotrienos), enzimas proteolíticas y lipolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS). Las enzimas pancreáticas activadas, la alteración microcirculatoria y la liberación de mediadores inflamatorios conducen a un rápido empeoramiento del daño y la necrosis pancreática. Independientemente de cuál sea el factor iniciador la gravedad del daño pancreático se relaciona con la lesión de las células acinares y la activación de las células inflamatorias y endoteliales.

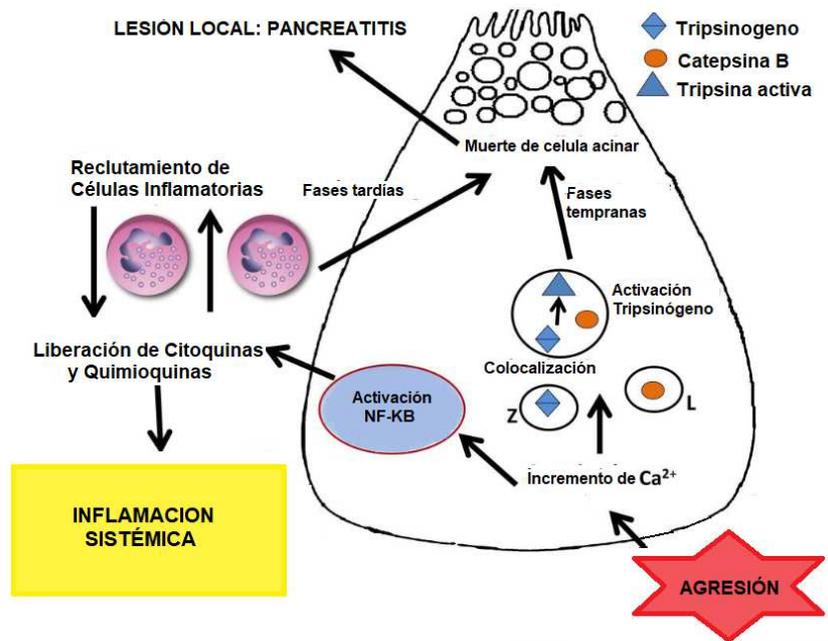


Figura 2: Fisiopatología de la pancreatitis aguda. Modificado de Dawra et al, 2011 [71]

El intestino sano normal impide la translocación de bacterias a la circulación sistémica a través de una compleja barrera que consta de componentes inmunológicos, bacteriológicos y morfológicos [56]. Durante el curso de la pancreatitis aguda, la barrera intestinal se ve comprometida, lo que permite la translocación de bacterias, lo que puede provocar una infección local y sistémica [72]. Las consecuencias de la translocación bacteriana desde el intestino en la pancreatitis aguda pueden ser letales [56]. En aproximadamente el 30 por ciento de los pacientes con PA puede producirse una infección bacteriana de los tejidos pancreáticos y peripancreáticos, lo que puede dar lugar a un fallo multiorgánico.

CLASIFICACIÓN

La clasificación de Atlanta basada en el Simposio de Atlanta en 1992 es el sistema de clasificación estándar para la gravedad de la pancreatitis aguda, distinguiendo

PA leve y grave [73]. Esta clasificación fue revisada en 2012, y ahora separa tres grupos diferentes: leve, moderadamente grave y grave [14].

De acuerdo con la clasificación revisada de Atlanta 2012 [14], la pancreatitis aguda puede ser subdividida en dos tipos basándose en hallazgos morfológicos:

- Pancreatitis edematosa: Cuando se visualiza por TAC se observa inflamación aguda del parénquima pancreático y de los tejidos peripancreáticos. Es posible el hallazgo de colecciones de líquido peripancreático, pero sin necrosis tisular reconocible. Habitualmente, los síntomas de los pacientes que presentan esta forma de pancreatitis se resuelven en el transcurso de una semana.
- Pancreatitis necrosante: Por TAC se observa inflamación aguda del páncreas asociada con necrosis del parénquima pancreático, del tejido peripancreático o de ambos.

Las complicaciones locales que se presentan en ambos grupos difieren. Así, en la pancreatitis edematosa, se le llama acumulación aguda de líquido peripancreático a una colección de fluido homogéneo, sin paredes definidas y adyacente al páncreas. Si la acumulación aguda de líquido peripancreático desarrolla una pared encapsulada bien definida, se denomina pseudoquiste pancreático. Esto ocurre generalmente en el transcurso de más de cuatro semanas. Las colecciones necróticas asociadas con la pancreatitis necrosante incluyen la colección necrótica aguda, que puede llegar a madurar en una necrosis encapsulada rodeada por una pared bien definida tras cuatro semanas. La acumulación necrótica aguda y la necrosis encapsulada pueden ser intrapancreáticas y / o extrapancreáticas. Es

importante clasificar correctamente una colección, ya que puede ser necesario un tratamiento diferente [14].

El fallo orgánico o disfunción orgánica, se define como un fallo a nivel del sistema cardiovascular, respiratorio o renal. La presencia de fallo orgánico se evalúa de acuerdo con la Puntuación modificada de Marshall (MMS), donde una puntuación de 2 puntos o más en cualquiera de los sistemas evaluados indica insuficiencia orgánica [74]. En función de la duración del mismo se puede distinguir entre fallo orgánico transitorio (< 48h) persistente (>48h). Si afecta a más de un órgano hablamos de fallo multiorgánico (FMO).

Se establecen a dos fases de la pancreatitis aguda.

Fase temprana: Generalmente transcurre durante la primera semana de hospitalización. La estrategia de tratamiento se encuentra condicionada por las complicaciones sistémicas. La diseminación por el organismo de citoquinas proinflamatorias se manifiesta clínicamente como “Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica” (SIRS). El SIRS está presente si se dan al menos dos de las siguientes condiciones: temperatura menor de 36 °C o fiebre superior a 38 °C; pulso superior a 90 latidos por minuto; frecuencia respiratoria superior a 20 respiraciones por minuto; y recuento de leucocitos superior a 12,000 cels/mm³, o inferior a 4,000 cels/mm³ [75]. Los primeros indicios de SIRS y de fallo orgánico son hallazgos bastante comunes al ingreso hospitalario, pero a menudo se resuelven en el transcurso de las primeras 48 horas. [76].

Fase tardía: Se superpone con la fase temprana, pero por norma general se considera que comienza después de la segunda semana. Es de duración variable, de

semanas a meses. Se caracteriza por la persistencia de signos de inflamación sistémica o por la presencia de colecciones locales. Durante esta fase, las colecciones locales se van encapsulando gradualmente y pueden llegar a requerir tratamiento.

En esta fase pueden desarrollarse infecciones del páncreas necrótico, o sepsis, como resultado de la translocación de bacterias de la luz intestinal a la circulación. El uso de antibióticos para prevenir la infección de las áreas necrosadas es un asunto controvertido [77].

La mortalidad en la PA grave se asocia en gran medida al desarrollo de fallo multiorgánico y a la necrosis pancreática infectada [78]. El fallo multiorgánico sigue generalmente un curso predecible, comenzando con los pulmones y seguido por el fallo intestinal y renal. El fallo cardiaco por lo general ocurre más tarde, mientras que la disfunción del sistema nervioso central puede ocurrir de forma temprana o tarde.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se establecen tres niveles de gravedad, en función de la presencia y duración de fallo orgánico y de complicaciones locales o sistémicas [14].

La pancreatitis aguda leve se caracteriza por la ausencia de insuficiencia orgánica y de complicaciones locales o sistémicas. Por lo general, estos pacientes pueden ser dados de alta durante la fase temprana, no requieren la realización de pruebas de imagen pancreáticas y la mortalidad es muy rara [14].

La PA moderadamente grave se caracteriza por la presencia de insuficiencia orgánica transitoria o complicaciones locales o sistémicas en ausencia de insuficiencia orgánica. Además de la disfunción orgánica asociada, la PA también puede agravar una comorbilidad preexistente [14]. Este es grupo heterogéneo de pacientes, algunos podrán ser dados de alta de forma precoz sin necesidad de intervención mientras que otros pueden requerir procedimientos especializados. La mortalidad en esta fase es aún mucho menor que en aquellos con PA grave [14]

En los pacientes con PA grave el fallo orgánico persistente que no se resuelve en 48 horas es la característica definitoria. La mortalidad de este subgrupo de pacientes puede llegar hasta el 30%, mayor aun en caso de necrosis infectada de forma concomitante [79].

TRATAMIENTO

General.

El tratamiento inicial de la PA es de apoyo. Son fundamentales el mantenimiento de la hidratación, la administración de oxígeno y el alivio del dolor. Casi la mitad de los pacientes con PA graven desarrollan insuficiencia orgánica y requieren tratamiento por parte de un equipo multidisciplinario [28], compuesto por gastroenterólogos, radiólogos, intensivistas, patólogos y cirujanos.

Nutrición.

Tradicionalmente, a los pacientes con PA se les ha administrado alimentación por vía parenteral para evitar estimular al páncreas. En los últimos años se han llevado a estudios en modelos animales que muestran mejoras en prevención de la atrofia

intestinal, y mejora de la función de barrera de la mucosa intestinal [80]. Varios estudios han demostrado que la alimentación por vía enteral no solo es segura, sino que también está asociada con menos complicaciones infecciosas, además de ser menos costosa que la nutrición parenteral [16]. Siempre que sea posible, se debería usar la alimentación enteral, reservando la nutrición parenteral para los pacientes que no toleran la alimentación enteral o en los que no se puede alcanzar una velocidad de infusión adecuada dentro de 2 a 4 días.

Prevención de la infección pancreática.

La infección pancreática o peripancreática es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con PA grave. Se desarrolla en el 40 a 70% de los pacientes con necrosis pancreática [81]. La infección generalmente ocurre al menos 10 días después del inicio de la PA. Entre los tratamientos para prevenir o reducir la incidencia de infección en pacientes con PA grave se incluyen la descontaminación intestinal selectiva y el tratamiento profiláctico con antibióticos. La descontaminación intestinal selectiva tiene como objetivo minimizar el riesgo de infección pancreática [16].

Varias guías respaldan el uso profiláctico de antibióticos en pacientes con PA grave [22, 28, 81]. Un metaanálisis de 8 ensayos clínicos aleatorizados (ECA) demostró que la reducción de la mortalidad se limitaba a los pacientes con PA grave a quienes se les administraron antibióticos de amplio espectro que podrían penetrar en el tejido pancreático [82]. Sin embargo, en un ECA reciente en el que se usó ciprofloxacina y metronidazol, no encontraron diferencias en la incidencia de infección pancreática vs placebo en pacientes con

PA grave [83]. Se ha informado de sobreinfección por hongos en pacientes que reciben antibióticos profilácticos [84]. Limitar el uso de antibióticos a 5 - 7 días puede evitar esta complicación [84]. Si la fiebre o la leucocitosis persisten más allá de los 7 a 10 días sin una fuente obvia de infección, se debe realizar una aspiración con aguja fina del área necrótica para descartar la infección [16].

Cirugía

El desbridamiento mediante cirugía o una técnica menos invasiva está indicado en pacientes con necrosis infectada [81]. Los resultados son mejores si la cirugía se retrasa hasta que la necrosis se haya organizado, generalmente alrededor de 4 semanas después del inicio de la enfermedad. Esta organización facilita la separación de los planos tisulares, evitando así la necesidad de resección de órganos [81]. Un ECA prospectivo que comparaba el desbridamiento temprano (<72 horas) con el tardío (> 12 días después del inicio de los síntomas) fue abortado prematuramente debido a la alta mortalidad en el grupo de cirugía temprana [85]. La cirugía no está indicada para pacientes con necrosis aséptica a menos que haya un gran deterioro clínico [16, 81].

El procedimiento quirúrgico de elección en la PA grave es el desbridamiento (necrosectomía) con la colocación de drenajes de gran calibre. La necrosectomía de acceso mínimo por vía percutánea o endoscópica ha mostrado resultados alentadores en pacientes que tienen una infección bien contenida o que son candidatos quirúrgicos pobres [86, 87].

Para los pacientes con pancreatitis biliar, se debe realizar una colecistectomía durante la hospitalización inicial o después de la resolución de la inflamación intraabdominal para prevenir la recurrencia [81].

MARCADORES DE GRAVEDAD EN PANCREATITIS AGUDA

Es muy importante realizar en el momento del ingreso del paciente afectado de PA, además de un correcto diagnóstico, una evaluación de la gravedad, para tratar de predecir que pacientes desarrollarán una PA grave. Esta evaluación tendrá consecuencias al abordar el tratamiento, o al determinar si un paciente debe ingresar en la UCI. Por otro lado, los recursos de la UCI son limitados y deben asignarse con prudencia [88].

Son varios los marcadores clínicos y de laboratorio, y varios los sistemas de puntuación que se han evaluado como marcadores predictivos óptimos durante las primeras 48 horas.

FACTORES CLÍNICOS Y SISTEMAS DE PUNTUACIÓN

Entre los factores clínicos que aumentan el riesgo de complicaciones o muerte se incluyen la edad superior o igual a 60 años, el consumo de alcohol, tabaquismo, obesidad, y diabetes mellitus tipo 2 [89].

El criterio de Ranson (tabla 1) es una regla de predicción clínica usada para predecir la gravedad de la pancreatitis aguda que fue introducido en 1974 [90]. La presencia de un parámetro se valora con 1 punto. Si la puntuación es superior o igual a 3 se considera que una pancreatitis severa es probable. Si es menor de 3 una pancreatitis severa es poco probable.

INTRODUCCIÓN

APACHE II es un sistema de clasificación, diseñado originalmente para su ser usado en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) [91]. Se aplica dentro de las 24 horas tras la admisión del paciente. La puntuación se calcula en base a 12 valores: Temperatura, presión arterial media, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, oxigenación, pH, sodio plasmático (Na), potasio plasmático (K), creatinina, hematocrito, recuento leucocitario, y escala de coma de Glasgow (GCS). A mayor puntuación, le corresponde más gravedad y un mayor riesgo de muerte.

En la admisión	A las 48 horas
1. Edad > 55 años	1. Calcio sérico (Calcemia) < 2,0 mmol/L (< 8.0 mg/dL)
2. Recuento de leucocitos > 16000 células/mm³	2. Caída del hematocrito > 10 %
3. Glucosa sérica (glucemia) > 10 mmol/L (> 200 mg/dL)	3. Hipoxemia (Presión parcial de oxígeno PO ₂ < 60 mmHg)
4. AST/GOT sérica > 250 IU/L	4. BUN/Urea sérica (Uremia) incrementada ≥ 1.8 mmol/L (≥ 5 mg/dL) después de hidratación con fluidos intravenosos (IV)
5. LDH sérica > 350 IU/L	5. Déficit de Bases > 4 mEq/L
	6. Secuestro de fluidos > 6 L

Tabla 1: Criterio de Ranson

El índice de Balthazar (Tabla 2), introducido por Balthazar *et al.* en 1985, se basa en la realización de un TAC. Son indicadores de gravedad de PA la presencia de necrosis pancreática y en menor medida, la presencia de colecciones peripancreáticas, siendo capaz de diferenciar pancreatitis edematosa vs necrotizante.

La suma de puntos permite obtener el índice de gravedad: 0 - 3 puntos (Bajo), 4 - 6 puntos (Medio), 7 - 10 puntos (Alto).

El score *Bedside Index of Severity in Acute Pancreatitis* (BISAP) es específico para pancreatitis aguda y evalúa 5 ítems: nitrógeno ureico en sangre (BUN) >25 mg/dL, alteración del estado mental, edad > 60 años, derrame pleural y presencia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). A cada ítem le corresponde un punto. A mayor puntuación, le corresponde más gravedad y un mayor riesgo de muerte.

Hallazgo	Puntos	Necrosis	Puntos adicionales
A. Páncreas normal	0	0	0
B. Agrandamiento pancreático	1	< 30	2
C. Inflamación pancreática y/o grasa peripancreática	2	30-50	4
D. Una colección líquida peripancreática	3	> 50	6
E. ≥ 2 colecciones líquidas o aire retroperitoneal	4		

Tabla 2: Índice de Balthazar

MARCADORES DE LABORATORIO

Los marcadores de laboratorio convencionales, como la creatinina, el hematocrito o el calcio, son marcadores de PA grave, pero en cuanto al fallo orgánico, se considera son más una consecuencia que un predictor. El aumento de los niveles de creatinina o del hematocrito es el resultado del agotamiento del volumen intravascular. Los niveles altos de creatinina que no mejoran a la reanimación con fluidos son un indicador de un mayor riesgo de PA grave [92]. Se ha demostrado que los niveles de creatinina $\geq 159 \mu\text{mol} / \text{l}$ a las 48 horas de ingreso se asocian con el desarrollo de necrosis pancreática [93]. El hematocrito $\geq 44\%$ al ingreso es un predictor de PA grave [94]. La hipocalcemia puede ser consecuencia del secuestro de calcio circulante y de albúmina en el espacio extracelular debido al aumento de la permeabilidad microvascular [95]. Se ha demostrado que la hipocalcemia es un predictor de PA grave [96].

MARCADORES DE INFLAMACIÓN

La proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína de fase aguda producida en el hígado en respuesta a citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF. Se ha demostrado que, durante la inflamación, la PCR opsoniza a las células dañadas, incluyendo a los productos de degradación nuclear, como la cromatina y las histonas, para facilitar su eliminación [97]. La PCR es un predictor de PA grave [98], pero no alcanza su nivel máximo hasta 48-72 horas después del inicio de los síntomas, por lo tanto no es un buen predictor de PA grave al ingreso en el hospital. Niveles de PCR por

encima de 150 mg / L a las 48 horas tras el inicio de los síntomas es indicador de PA grave [22].

Citoquinas

Se han estudiado varias citoquinas y receptores como predictores de PA grave. Entre los marcadores más estudiados se encuentran TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10. El TNF- α es una citoquina clave en el proceso inflamatorio, que además induce la producción de citoquinas adicionales, como IL-6 e IL-8. Está demostrado que los niveles elevados de TNF- α al inicio de los síntomas predicen una PA grave [99, 100]. Sin embargo, la detección de TNF- α en suero supone un desafío debido a que se elimina rápidamente por vía hepática. Además, hay estudios contradictorios que no muestran ningún valor predictivo para el TNF- α [101, 102]. Hay muchos estudios que muestran que la IL-6 es un predictor de PA grave [103-106]. Si bien hay varios estudios que muestran que la IL-8 puede predecir la PA grave [106-108], también hay publicados trabajos con resultados contradictorios [109]. La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria muy potente, que actúa inhibiendo la síntesis y liberación de otras citoquinas proinflamatorias de radicales libres de oxígeno por parte de macrófagos y linfocitos T colaboradores. Pero, por otra parte, estimula la proliferación de linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas. Hay varios estudios que demuestran la IL-10 tiene un efecto negativo en la PA, actuando como un predictor de gravedad [104, 105, 110]. Además de las citoquinas mencionadas anteriormente, diversas citoquinas han mostrado valor predictivo en PA grave, entre ellas se encuentran:

- El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) [111-113].

- El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [114].
- La IL-1 β , [105].
- El antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1RA) [105, 109].
- El oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO)- α [108].
- La IL-18 [115].
- La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP- 1) [116].
- El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MMIF) [117].
- La IL-12 [118].
- La IL-15 [119].
- El factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) [120].

Procalcitonina

La procalcitonina se usa en la práctica clínica como un marcador de sepsis en pacientes críticos [121]. En pacientes con pancreatitis aguda, la procalcitonina puede emplearse como un predictor de gravedad [122, 123]. Sin embargo, es en la predicción de necrosis pancreática infectada y de muerte del paciente donde el papel de la procalcitonina se encuentra mejor establecido [122, 124]. Los niveles de procalcitonina disminuyen con la mejoría clínica tanto en la sepsis [125] como en la PA [122, 124]. Sin embargo, el ensayo de procalcitonina es todavía muy costoso, lo que puede dificultar su uso clínico.

Receptor soluble de la uroquinasa

El receptor soluble de la uroquinasa es un marcador de inflamación sistémica, que ha mostrado buenos resultados en la predicción de la evolución de pacientes

críticos [126], con mejores resultados que la PCR y la procalcitonina [127, 128]. Recientemente, ha sido descrito como un predictor de gravedad, fallo orgánico y mortalidad en PA [129, 130].

Pentraxina 3

La pentraxina 3 (*Pentraxin-related protein* o PTX3), es un receptor de reconocimiento de patrones (PRR), y una proteína de fase aguda. Se ha investigado su uso como marcador en pacientes críticos [131], mostrando una capacidad similar a la de la calcitonina para la predicción de sepsis grave y de mortalidad [132]. En PA, se ha demostrado que la pentraxina 3 es un marcador de gravedad, que alcanza sus valores máximos antes que la PCR [133]. En un reciente estudio en el que se pusieron a prueba una amplia gama de citoquinas y biomarcadores como predictores de gravedad en pancreatitis aguda, PA grave; la pentraxina 3 destacó como un predictor independiente de gravedad [134].

Otros marcadores

Se ha investigado el papel de diversos marcadores de activación endotelial como predictores de gravedad en PA. Por ejemplo, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la E-selectina y la P-selectina, se encuentran elevadas en PA, y están asociadas a disfunción orgánica [135-139]. Sin embargo, existen trabajos que muestran resultados contradictorios [123].

El factor von Willebrand ha sido asociado hace poco al síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) en PA [139]. El CD73 es una enzima que genera adenosina, con actividad antiinflamatoria. Se ha informado de que la forma soluble de CD73 se

correlaciona de forma inversa con la gravedad de la PA [140]. La angiopoyetina 2 se asocia con disfunción orgánica persistente y PA grave [141]. Otros marcadores inflamatorios adicionales que predicen gravedad en PA incluyen a CD11b, un marcador de activación de monocitos y macrófagos [142], a la proteína reguladora del complemento CD59 [143], metaloproteinasa de la matriz 8 [144] y a la metaloproteinasa de la matriz 9 [145]. La disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos se asocia con gravedad en PA y predice el desarrollo de disfunción orgánica [96, 142, 146].

MARCADORES DE MUERTE CELULAR

Se ha estudiado el papel de varios marcadores moleculares asociados a daño (DAMP) en PA. De entre ellos HMGB1 (*high-mobility group box chromosomal protein 1*) es el marcador más estudiado como predictor de PA grave [147-149]. También se ha estudiado el papel del receptor para compuestos de glicosilación avanzada (RAGE), que es un receptor para HMGB1 y otros ligandos. Se ha demostrado que los niveles de RAGE son significativamente más altos en pacientes con PA grave y fallo orgánico que en aquellos con PA leve [150]. Algunos estudios muestran también que el ADN libre [148, 151], las histonas [152], y los nucleosomas circulantes [153], son predictores de gravedad en PA.

FACTORES INMUNOLÓGICOS DE LA INFLAMACION EN PANCREATITIS AGUDA

La inflamación es una compleja red estrechamente regulada de diferentes respuestas protectoras. humorales y celulares, a estímulos dañinos tales como patógenos microbianos o células dañadas. tiene tres funciones esenciales: la

primera es suministrar moléculas y células efectoras adicionales a los focos de infección o de daño tisular; la segunda es inducir coagulación local de sangre, que proporciona una barrera física para la diseminación de la infección en el torrente sanguíneo; y la tercera es promover la reparación de tejido dañado. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva e incontrolada (como ocurre en la sepsis o en la pancreatitis aguda) es perjudicial para el enfermo, como también lo es una reacción inflamatoria insuficientemente potente.

Una de las características del sistema inmunitario es la gran diversidad de mecanismos efectores de los que dispone. El sistema inmunitario es capaz de diferenciar las células propias de las extrañas y, además, conservar la información de la respuesta incluso después de la eliminación de la amenaza mediante la producción de células de memoria. La “especificidad” y la “memoria” son por tanto dos de las características más importantes de la respuesta inmunitaria adaptativa humana, ya que el organismo es capaz de responder de forma más específica y más potente tras reiterados contactos con él antígeno. Por el contrario, la respuesta inmunitaria innata es inespecífica y no tiene memoria a largo plazo.

El sistema inmunitario innato es la primera barrera de defensa contra las infecciones. Actúa mediante el reconocimiento de estructuras altamente conservadas a través de receptores de reconocimiento de patrones (**PRR**). Estos receptores se encuentran en las células fagocitarias, los mastocitos, las células dendríticas, los eosinófilos y las células NK. Entre las moléculas reconocidas por los PRRs se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* o **PAMP**), que derivan de patógenos invasores; y los patrones moleculares asociados a daño (*Damage Associated Molecular Patterns* o

DAMP), que son el resultado del estrés endógeno [154]. La familia de receptores tipo Toll (TLR), así como los receptores depuradores y los receptores de hidratos de carbono, todos ellos presentes en los macrófagos, reconocen varios de estos modelos PAMP y provocan la activación celular, lo que a su vez induce la liberación de quimioquinas y leucotrienos. De los PRR, los receptores tipo Toll (*Toll-like receptor* o **TLR**) son la familia mejor caracterizada. La activación de los TLR activa vías de señalización, como NF- κ B, MAPK y STAT, lo que conduce a una mayor transcripción de genes inflamatorios y a la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina (IL) 1 [155]. Por tanto, este reconocimiento es capaz de activar las rutas de síntesis de citoquinas proinflamatorias con el objetivo de hacer frente a la infección [156].

El sistema inmunitario adaptativo reconoce antígenos altamente específicos, presentados por células presentadoras de antígenos, a través de receptores específicos. Está mediado principalmente por los linfocitos T y B, ya que ambos tipos celulares reconocen al antígeno e inician el proceso de su erradicación, y de la fuente que lo produce, a través de diversos mecanismos efectores. El antígeno se define de forma clásica como una molécula capaz de inducir, en los linfocitos B, la síntesis y secreción de una molécula específica contra el “cuerpo extraño” a la que se denomina anticuerpo. Esta definición ha sido ampliada a la de una molécula que es reconocida por receptores específicos presentes en la superficie de las células T y de las células B, siendo ambos tipos de linfocitos los que, cuando se activan, proporcionan respuestas dirigidas contra el patógeno invasor.

La respuesta innata y la respuesta adaptativa del sistema inmunitario interactúan y colaboran a diferentes niveles: los fagocitos regulan la expresión de moléculas

coestimuladoras de las CPA, activando de este modo la respuesta de las células T al antígeno; las células T activadas liberan citoquinas que a su vez activan a los fagocitos; los anticuerpos generados en la respuesta adaptativa se unen a su antígeno y el inmunocomplejo formado activa el sistema de complemento.

Células de la inmunidad innata en la inflamación

Las células de los tejidos son capaces de segregar mediadores solubles de inflamación cuando son invadidas por organismos extraños o lesionadas por cualquier otro agente físico o químico. Estos mediadores inflamatorios humorales activan y reclutan leucocitos al sitio de la inflamación. La adhesión de leucocitos al endotelio es esencial para el desarrollo de una respuesta inmunitaria apropiada. Los neutrófilos son las primeras células que se infiltran, tras ellos acudirán después los monocitos / macrófagos y los linfocitos.

Neutrófilos

Los neutrófilos se definen tradicionalmente como un tipo de célula mieloide con una vida media corta, morfología nuclear específica, contenido de gránulos definido y expresión en la superficie de marcadores específicos, como CD66b en humanos [157]. Sin embargo, durante la última década, han sido varias las definiciones que se han hecho de los neutrófilos [158], desde células inmaduras numerosas en médula ósea y con capacidad de ser movilizadas rápidamente a la circulación; a células con perfiles no superpuestos y funciones reguladoras en situaciones fisiológicas y patológicas, incluidas infecciones, lesiones, autoinmunidad y cáncer.

Los neutrófilos son los leucocitos circulantes más abundantes en los seres humanos. Cada día se producen aproximadamente 10^{11} , con tiempos de tránsito de la última división celular en la médula ósea hasta su liberación en la circulación periférica de aproximadamente 6 a 7 días [158]. Aunque en general se acepta que la vida media de los neutrófilos en circulación es menor a 1 día, un estudio publicado en *Blood* en 2010 calculó una vida útil de hasta 5,4 días [159].

De acuerdo con los paradigmas actuales, el desarrollo de neutrófilos comienza a partir de progenitores de granulocitos y monocitos (GMP) y progresa a través de un continuo de etapas de maduración. La caracterización actual del desarrollo de los neutrófilos define dos fases principales: una etapa proliferativa en la que las GMP se diferencian en mieloblastos, promielocitos y mielocitos y una etapa no proliferativa en la que los mielocitos dan lugar a metamielocitos, células en cayado y finalmente neutrófilos maduros [158].

El reclutamiento de neutrófilos es uno de los hitos de la fase temprana de la inflamación. En la inflamación se produce factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que es esencial para aumentar la producción de neutrófilos en la médula ósea y satisfacer así la mayor necesidad, y que además tiene el efecto de ampliar la vida media de los neutrófilos en la circulación a varios días [160, 161].

El endotelio vascular se activa mediante citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 e IL-6. TNF y la IL-1 inducen, a través de la activación de diferentes factores de transcripción, un aumento de la expresión de la selectina E, así como de moléculas de adhesión intercelular I (ICAM-1) y moléculas de adhesión vascular I (VCAM-1)

en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Las citoquinas proinflamatorias inducen además la expresión de integrinas como CD11b / CD18 en la superficie de los neutrófilos [162]. Como resultado, se produce la adhesión paso a paso (unión inicial, rodadura, adhesión firme) de neutrófilos a las paredes vasculares y su migración transendotelial [161]. La pared endotelial activada secreta también, IL-8, que activa neutrófilos adicionales [161]. Las moléculas de adhesión selectina-L, CD11b y CD18 sirven como marcadores de activación de neutrófilos.

Los neutrófilos activados contribuyen a empeorar la lesión tisular mediante la generación de radicales libres de oxígeno, la desgranulación de proteasas, la inducción de fallo orgánico, y el reclutamiento de leucocitos adicionales [163]. Existen mecanismos de control para evitar la infiltración excesiva de neutrófilos y prevenir así el daño tisular, pero estos mecanismos pueden fallar [161]. Además, los neutrófilos desempeñan un papel importante en el desarrollo de complicaciones locales y sistémicas en la PA grave, como el daño celular acinar, y la lesión pulmonar asociada a pancreatitis [164, 165]. De hecho, se ha demostrado en ratones que el agotamiento de neutrófilos atenúa la pancreatitis aguda experimental [165].

Monocitos / macrófagos

Los macrófagos son células de estirpe mieloide que están estratégicamente ubicadas en la práctica totalidad de los tejidos del cuerpo, donde ingieren y degradan las células muertas, los desechos y los materiales extraños; y organizan los procesos inflamatorios [166]. Los macrófagos se clasifican como parte del

sistema de fagocitos mononucleares, junto con los monocitos y las células dendríticas (CD) [166].

En la actualidad se acepta la existencia de macrófagos tisulares de dos orígenes distintos: Una población de macrófagos de origen prenatal, que es mayoritaria; y una segunda de macrófagos derivados de monocitos infiltrantes de tejidos [166]. Con respecto a los macrófagos de origen prenatal, se mantienen dentro de su tejido de residencia y son autosuficientes e independientes de la entrada hematopoyética adicional [166]. El desarrollo de macrófagos tisulares derivados de monocitos está asociado con reacciones inflamatorias patológicas, pero también homeostáticas [166].

Durante la reacción inflamatoria, los monocitos circulantes son reclutados a los tejidos, donde se diferencian en macrófagos [166]. Los macrófagos derivados de monocitos generalmente muestran una vida útil limitada, aunque se han reportado excepciones [166]. La migración a través de la pared endotelial está mediada por varias moléculas de adhesión y es muy similar a la de los neutrófilos [162]. Los macrófagos son la principal fuente de citoquinas, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias; quimiocinas; y mediadores lipídicos, y reclutan células inflamatorias adicionales en el sitio de la inflamación [167]. Los macrófagos son los principales productores de citoquinas inflamatorias, como TNF, IL-1 β e IL-6. También secretan altos niveles de quimiocinas, como CCL2 y CXCL8, que contribuyen a la afluencia de monocitos y neutrófilos, y perpetúan la respuesta inflamatoria [168]. Durante la inflamación, los macrófagos actúan como fagocitos y como células presentadoras de antígenos.

Células Dendríticas

Las células dendríticas representan una familia heterogénea de células presentadoras de antígenos de estirpe mieloide, compuesta por varios subconjuntos diferentes [169]. Se encuentran en todo el organismo, sumando del 2 a 4% de todos los leucocitos en cualquier tejido; sin embargo, la composición de los diferentes subconjuntos varía entre órganos [169]. Estos subconjuntos se definen por su localización, expresión de proteínas de superficie y funcionalidad. Las CD se clasifican en dos clases distintas: células dendríticas plasmocitoides (pDC), y las CD convencionales, que tienen un papel crucial en la inflamación ya que son las CPA más importantes además de actuar como instructores de los linfocitos T [169].

Todas las CD se desarrollan en la médula ósea a partir de una célula progenitora común de macrófagos y células dendríticas (MDP), que a continuación se diferencia al progenitor común de células dendríticas (CDP). Los CDP dan lugar en la médula ósea a los progenitores de células dendríticas plasmocitoides y pre-CD. Las pDC completan su último paso de maduración en la médula ósea, antes de que salgan al torrente sanguíneo como células maduras. Por otro lado, las células pre-CD migran a través del sistema vascular a su residencia final en los tejidos u órganos linfoides, donde terminan su diferenciación en distintos subconjuntos de CD convencionales [169].

Tras la estimulación y posterior activación de TLR7 y TLR9 las células dendríticas plasmocitoides, producen grandes cantidades de interferón de tipo I (principalmente IFN- α e IFN- β), que median una amplia gama de efectos e inducen

la maduración de la pDC. [12] Además, también producen las citoquinas IL-12, IL-6 y TNF- α , lo que ayuda a reclutar otras células inmunitarias hacia el sitio de la infección [170].

Se ha demostrado que en la PA experimental hay un marcado aumento en el número de células dendríticas intrapancreáticas, donde parecen tener un doble papel. Son capaces de liberar citoquinas proinflamatorias, pero también actúan protegiendo al páncreas de lesiones graves. Sin embargo, estos mecanismos no se comprenden del todo [171].

Mastocitos

Los mastocitos son un tipo de granulocitos que se encuentran principalmente en la piel, mucosas y en la periferia de los vasos sanguíneos.

El desarrollo de mastocitos se produce en la médula ósea a partir de precursores mieloides CD34+ y CD117+. El progenitor mielóide común (CMP) tiene la capacidad de dar lugar a las células progenitoras de megacariocitos y eritrocitos o alternativamente, a células progenitoras de granulocitos y macrófagos (GMP). A su vez, el GMP puede dar lugar a macrófagos, eosinófilos, neutrófilos o la célula progenitora de basófilos/mastocitos (BMCP) [172].

La formación del mastocito requiere la expresión por parte de la célula progenitora de los factores de transcripción “proteína de unión a GATA 2” (GATA2) y “proteína de unión a CCAAT / enhancer alpha a” (C/EBP α) [172].

Dentro del cuerpo humano, los mastocitos están presentes de manera ubicua, especialmente en tejidos que se enfrentan al medio ambiente externo, por ejemplo,

la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal. En consecuencia, los mastocitos tienen un importante en la iniciación de respuestas inmunitarias tempranas, como la defensa del huésped contra los patógenos, la degradación de toxinas, la regulación de la homeostasis, remodelación tisular y reparación [173].

Tras su activación, proliferan en el sitio de la inflamación y liberan agentes vasoactivos tales como histamina, además de diversos mediadores inflamatorios y enzimas proteolíticas. Los mastocitos están involucrados en reacciones alérgicas y anafilácticas.

Sin embargo, no solo intervienen en las alergias, sino también en muchas funciones fisiológicas. En el intestino, los mastocitos regulan el flujo sanguíneo, la contracción del músculo liso y la peristalsis, la secreción de la mucosa y las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas [174, 175].

La secreción de quimiocinas por parte de los mastocitos parece ser esencial para la respuesta temprana de los neutrófilos a la infección. Los mastocitos también contribuyen a la respuesta inmunitaria adaptativa a través de la liberación de citoquinas inmunorreguladoras, lo que influye en el desarrollo de respuestas específicas por parte de los linfocitos T y B [176].

En la PA experimental, se ha demostrado que los mastocitos activados se encuentran involucrados en la disfunción de barrera endotelial tanto en el páncreas como en los tejidos extrapancreáticos, particularmente en los pulmones y en el intestino, y contribuyen al desarrollo de fallo orgánico [177].

Inducción de la respuesta inmunitaria

Las células del sistema inmunitario innato son las encargadas de inducir la respuesta inflamatoria, lo que resulta en el reclutamiento de nuevas células y moléculas efectoras circulantes al foco de inflamación. Para la detección de los microbios o del daño celular hacen uso de receptores de reconocimiento de patrones, y la organización de la respuesta inmunitaria es a través de la producción de citoquinas y quimioquinas que causan, cómo destruyen estos patógenos y cómo organizan las respuestas inflamatorias de la corriente descendente a través (citoquinas quimioatrayentes).

Receptores de reconocimiento de patrones

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) se encuentran incluidos dentro de los llamados receptores de la inmunidad innata, en la que desempeñan un papel crucial para su adecuado funcionamiento [178]. La función de los PRR es de servir de sensores para detectar moléculas que son típicas de los patógenos, de forma no antígeno-específica [178]. Los PRRs son receptores transmembrana o citosólicos expresados, principalmente, por células del sistema inmunitario innato, como las células dendríticas, macrófagos, monocitos y neutrófilos, aunque también los expresan células de la inmunidad adquirida y células no inmunitarias [179, 180].

Los PRRs identifican dos clases de moléculas: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que se encuentran asociados con patógenos microbianos; y patrones moleculares asociados a daño (DAMP), que están asociados con la liberación al medio extracelular de componentes de las células del hospedador,

cuando sufren daño celular o la muerte. Las PRR también juegan un papel importante en la inducción de vías antimicrobianas, y sirven de nexo de unión con la respuesta inmunitaria adaptativa mediante la liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias y quimioquinas [178, 181]. Los PRRs tienen, por tanto, un papel fundamental, en el mantenimiento de la mucosa intestinal, contribuyendo a evitar la invasión de bacterias gracias a su actividad antimicrobiana.

Entre los PAMPs reconocidos por los PRRs se encuentran carbohidratos bacterianos (como el lipopolisacárido o la manosa); ácidos nucleicos (como ADN bacteriano o viral, o ARN); péptidos bacterianos (flagelina, factores de elongación de microtúbulos); peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos (de bacterias Gram positivas); N-formilmetionina; lipoproteínas y glucanos fúngicos; y quitina.

Los DAMPs son señales de estrés celular, entre ellos se encuentra el ácido úrico, y el ATP extracelular, además de muchos otros compuestos.

Los PRRs se clasifican según su especificidad de ligando, función, localización y/o relaciones evolutivas. De acuerdo con su localización, se pueden dividir en PRRs de membrana y citoplasmáticos.

Entre los PRR de membrana se incluyen los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina de tipo C (CLR).

Los PRR citoplásmicos incluyen a los receptores tipo NOD (NLR) y los receptores tipo RIG-I (RLR).

Los TLRs y NOD2 tienen un papel significativo en la mucosa digestiva, donde intervienen en la defensa frente a microorganismos. A continuación, se discuten en mayor profundidad.

Receptores tipo NOD

Los receptores tipo dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NOD), llamados NLR por sus siglas en inglés (*NOD like receptor*) son una familia de receptores que detectan una amplia gama de ligandos dentro del citoplasma de las células. Esta familia tiene 23 miembros en humanos, donde actúan como sensores intracelulares de PAMP y DAMP que están asociados con el estrés celular [178].

Son parte de los receptores de reconocimiento de patrones [2] y desempeñan un papel clave en la regulación de la respuesta inmunitaria innata [182]. Los NLR pueden cooperar con los receptores *Toll-like* para regular la respuesta inflamatoria y apoptótica. Se encuentran en linfocitos, macrófagos, células dendríticas, además de en células no inmunitarias, como las células epiteliales [182].

Los NLR constituyen una familia de proteínas altamente conservadas a través de la evolución. Se han descubierto proteínas homólogas en muchas especies animales, incluso en el reino vegetal [183, 184].

Esta familia de proteínas se define por una estructura tripartita que consiste en (a) un dominio de interacción proteína-proteína N-terminal variable, definido por el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), dominio de pirina (PYD), dominio transactivante ácido o repetidor de inhibidor de baculovirus (BIR); (b) un dominio central de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), que media la auto-

oligomerización que se produce durante la activación (4); y (c) una repetición C-terminal rica en leucina (LRR) que detecta PAMP.

Esta familia de proteínas se define por una estructura con tres partes [182, 185]:

- Un dominio N-terminal de interacción proteína-proteína. La estructura de este dominio es variable. Contienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), un dominio de pirina (PYD), y un dominio ácido, o bien un dominio de repeticiones de inhibidor de baculovirus (BIR) [182, 185]. Los dominios CARD y PYD pertenecen a la superfamilia del dominio de muerte (DD), implicado en apoptosis e inflamación [182]. Los dominios CARD y PYD tienen la capacidad de interactuar con otras proteínas que contienen CARD y PYD. El dominio BIR se identificó originalmente en el contexto de regulación de la apoptosis [182].
- Un dominio NOD central, que media la auto-oligomerización que se produce durante la activación [182, 185, 186].
- Una repetición C-terminal rica en leucina (LRR) que participa en el reconocimiento de PAMP microbianos, o de DAMP de origen endógeno. [182, 185].

En general, la función principal de los NLR es la activación de las vías de señalización inflamatorias. En muchos aspectos, la vía de señalización de los NLR es muy similar a la de los TLR, que se discutirá más adelante. Se han identificado tres rutas de activación tras la activación de NLR después del reconocimiento de PAMP: NF- κ B, MAPKs y caspasa-1.

Los NLR mejor caracterizados son NOD1 y NOD2, que actúan a través de las rutas de NF- κ B y MAPK [187-190]. Tras la unión del ligando, NOD1 y NOD2 sufren un cambio conformacional que favorece la auto-oligomerización mediada por el dominio NBD. Esta oligomerización promueve el reclutamiento de la proteína adaptadora RIPK2 que es esencial para la activación tanto del NF- κ B como de las MAPK. RIPK2 es una serina-treonina quinasa que se ubiquitina tras la interacción con NOD1 o NOD2 a través de interacciones homotípicas CARD-CARD [191]. RIPK2 recluta y activa recluta a la subunidad reguladora de la I-kappa-B quinasa gamma ($I\kappa$ K γ) del complejo $I\kappa$ K, o modulador esencial de NF- κ B (NEMO). RIPK2 también facilita, a través de la ubiquitinación, el reclutamiento de TAK1 al complejo TAK1-TAB2-TAB3. La combinación de NEMO y TAK1 promueve la posterior fosforilación de la subunidad $I\kappa$ K β de $I\kappa$ K por TAK1 y da como resultado la fosforilación y degradación de $I\kappa$ B α , un paso crítico que permite la activación de NF- κ B [192].

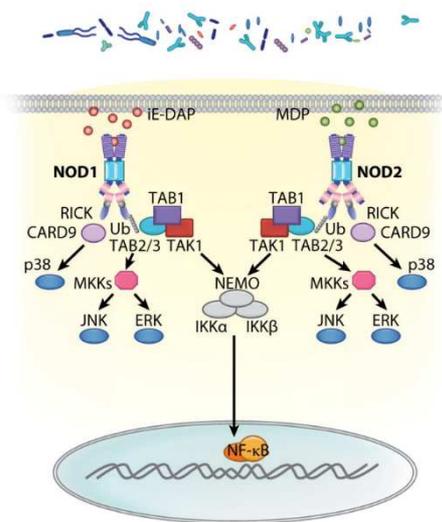


Figura 5: Vía de activación de NOD1 y NOD2. Modificado de [185]

A través de la vía de NF- κ B y de las MAPK, se activa la transcripción de citoquinas y mediadores inflamatorios, entre los que se incluyen TNF- α , IL-6, IL-8, CCL2, CXCL8, CXCL2, MCP-1, además de otros péptidos antimicrobianos como las defensinas. La liberación de estos factores promueve el reclutamiento y la activación de células del sistema inmunitario innato, como neutrófilos y monocitos [185].

Receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (TLR) son una clase de proteínas que desempeñan un papel clave en el sistema inmunitario innato. Es una familia de receptores transmembranosos, que reconocen patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos, y estimulan una amplia variedad de respuestas inflamatorias. Se expresan en células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas, donde tienen un importante papel en el vínculo entre la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa. Han sido descritos en mamíferos 13 tipos de TLRs, de los que solo 10 se encuentran en humanos (TLR1 – TLR10) [181]. Los receptores tipo Toll reciben su nombre por su similitud con la proteína codificada por el gen *Toll* identificado en *Drosophila* en 1985 [193].

La porción citoplásmica de los receptores tipo Toll tiene una gran similitud con la de la familia del receptor de IL-1, por lo que se agrupan en una superfamilia llamada “superfamilia receptor Tipo Toll/ receptor IL-1”, llamada TIR por sus siglas en inglés. A pesar de esta similitud, las porciones extracelulares de ambos receptores no están estructuralmente relacionadas, el receptor de IL-1 se caracteriza por la presencia de un dominio similar a Ig, mientras que los

receptores *Toll-like* tienen repeticiones ricas en leucina en el dominio extracelular [194].

Existen tres subgrupos de dominios TIR. En el subgrupo 1 se incluyen receptores para interleucinas expresados por macrófagos, monocitos y células dendríticas, con dominios de Inmunoglobulina extracelulares. En el subgrupo 2 se encuentran los TLR clásicos, que se unen directa o indirectamente a moléculas de origen microbiano. Un tercer subgrupo de proteínas que contienen dominios TIR incluye a proteínas adaptadoras que son exclusivamente citosólicas y median la señalización de las proteínas de los subgrupos 1 y 2.

Los TLRs se pueden clasificar en función de su localización celular. Si se expresan en la membrana plasmática o en vesículas intracelulares. Los TLRs extracelulares incluyen a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10, y reconocen componentes presentes en la membrana microbiana tales como lípidos, lipoproteínas y proteínas. Por otro lado, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran localizados en vesículas intracelulares, y reconocen principalmente ácidos nucleicos microbianos.

Se piensa que los TLR actúan como dímeros. La mayoría de los TLR funcionan como homodímeros, sin embargo, TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6, teniendo cada dímero una especificidad de ligando diferente. Pueden ser necesarios correceptores para el reconocimiento de ciertos ligandos, como en el caso del reconocimiento de lipopolisacárido (LPS) a través de TLR4, que requiere de MD-2 [194].

La dimerización de los TLR induce la activación de las vías de señalización, que se originan a partir de un dominio TIR citoplasmático. Cuando se activan, los TLR

reclutan moléculas adaptadoras dentro del citoplasma de las células para propagar una señal. Se conocen moléculas adaptadoras involucradas en la señalización. Estas proteínas se conocen como MyD88, Tirap (también llamado Mal), Trif y Tram (molécula adaptadora relacionada con TRIF). Se ha demostrado que hay diferentes vías de señalización para distintos TLRs. Las vías de señalización se pueden clasificar en vías dependientes de MyD88 y dependientes de TRIF [194, 195].

Vía dependiente de MyD88

La respuesta dependiente de MyD88 tiene lugar tras la dimerización de los TLR. MyD88 participa en la vía de señalización de todos los TLR a excepción de TLR3, y conduce finalmente a la activación de las vías de NF-KB y MAPK.

MyD88 posee un dominio TIR en su extremo C-terminal y un dominio de muerte (DD, del inglés *death domain*) en la porción N-terminal. MyD88 se une al TLR en forma de homodímero a través de su dominio TIR y, tras la estimulación recluta a las serin-treonin quinasas IRAK-1 e IRAK-4. A continuación MyD88 facilita la fosforilación de IRAK-1 mediada por IRAK-4 [194]. Una vez activado IRAK-1 se asocia con TRAF6.

IRAK-1 y TRAF-6 se escinden e interaccionan con el complejo TAK1 / TAB. La fosforilación del complejo induce su separación, dirigiéndose a continuación al citosol. Una vez allí, induce la activación del complejo IκB quinasa (IKK). Una vez activado, IKKβ del complejo IKK induce la fosforilación y la posterior degradación de IκB, permitiendo que el factor de transcripción NF- KB penetre en el núcleo [196].

TAK-1 también produce activación de la vía de las MAPK [196], que desemboca la activación de la proteína activadora 1 (AP-1), un factor de transcripción heterodimérico implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones [197].

Vía dependiente de TRIF

TRIF participa en la ruta de señalización tanto de TLR3 como de TLR4. TLR3, se activa tras el reconocimiento de RNA de doble cadena, y TLR4 cuando reconoce LPS. Una vez activados, se produce el reclutamiento de TRIF. TRIF activa a las quinasas TBK1 y RIPK1. A continuación, el complejo de señalización TRIF / TBK1 fosforila a IRF3 permitiendo su translocación al núcleo y la producción de Interferón tipo I. Al mismo tiempo, la activación de RIPK1 causa la poliubiquitinación y la consiguiente activación de la transcripción de TAK1 y NF-KB de la misma manera que ocurre en la vía dependiente de MyD88 [194, 198].

TLR4 es el único de los TLR que usa los cuatro adaptadores. El complejo formado por TLR4, MD2 y LPS recluta a TIRAP y MyD88, ambos son adaptadores que contienen el dominio TIR. El complejo así formado inicia la activación de NF-KB, y más tarde de MAPK [198]. A continuación, el complejo TLR4-MD2-LPS es endocitado, y en el endosoma forma un complejo de señalización con los adaptadores TRAM y TRIF. Esta ruta dependiente de TRIF conduce de nuevo a la activación y producción de interferones de tipo I. También activa a NF-KB, induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias [198].

La señalización a través de los TLR finalmente conduce a la inducción o supresión de genes que orquestan la respuesta inflamatoria. En total, miles de genes se activan mediante la señalización de TLRs.

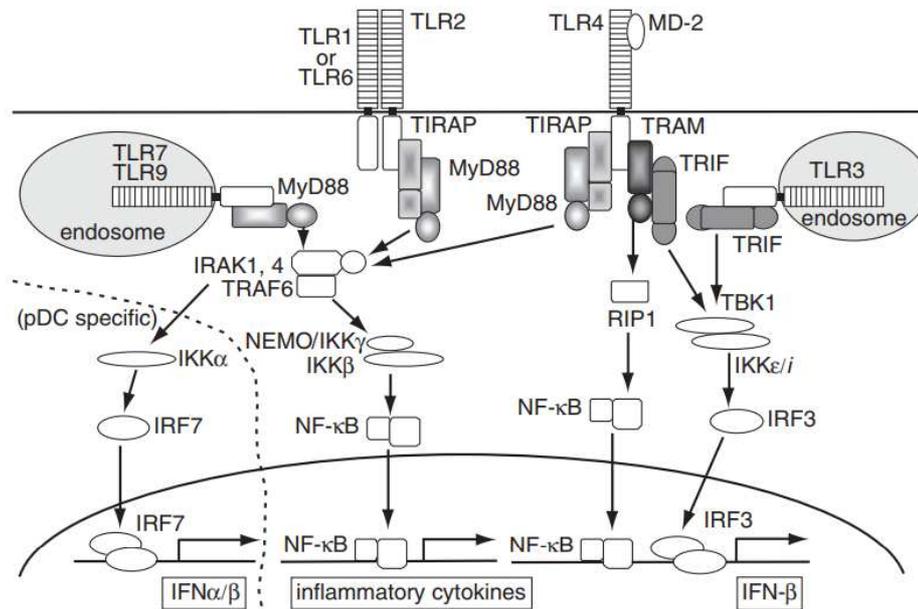


Figura 6: Vías de señalización a través de TLR. Las vías de señalización TLR constan de dos cascadas principales que dependen de adaptadores que contienen el dominio TIR, como MyD88 y TRIF. MyD88 participa en la señalización de todos los TLRs, a excepción de TLR3, conduciendo a la inducción de genes de citoquinas inflamatorias. TRIF participa en la señalización de TLR3 y TLR4, y conduce a la activación de IRF3 y NF-κB, y la posterior inducción de IFN-β. Figura tomada de [198].

Vías de señalización. *NF-κB*

La señalización celular es un proceso mediante el cual las células coordinan sus acciones de acuerdo con las señales que reciben a través de receptores de la superficie celular. El NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) es un complejo proteico que pertenece a la familia Rel / NF-κB de factores de transcripción. En total, se han identificado cinco miembros de esta familia de

factores de transcripción, designados como p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 y NF- κ B2 que incluye a RelA, c-Rel, RelB, NF- κ B1 y NF- κ B2. La familia de NF κ B tiene un papel regulador clave en el desarrollo inmunitario, las respuestas inmunitarias, la inflamación y el cáncer [199-203].

El sistema NF- κ B está estrechamente regulado; los defectos en su regulación han sido implicados en una amplia gama de enfermedades, desde procesos tumorales hasta trastornos inflamatorios e inmunológicos [204, 205].

El NF-KB pertenece a la categoría de los factores de transcripción llamados de “acción rápida”, que engloba a aquellos factores de transcripción que no requieren ser sintetizados para activarse, ya que están presentes en la célula en forma inactiva. Otros factores de transcripción en esta categoría son c-Jun, STATs, y algunos receptores nucleares hormonales. Esto permite activar esta vía de forma muy rápida ante estímulos celulares, que van desde citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1 β ; a especies reactivas de oxígeno (ROS), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), cocaína o incluso radiaciones ionizantes [206-211].

Los cinco miembros de esta familia de proteínas forman homo o heterodímeros y comparten algunas características estructurales, incluido un dominio de homología Rel (RHD) en el extremo amino-terminal, que es esencial para la dimerización, así como para la unión a elementos de ADN afines [212]. Tres miembros de la familia (RelA, RelB y c-Rel) contienen dominios de transactivación C-terminal, que son esenciales para la actividad transcripcional. A diferencia de los otros miembros de la familia, NF- κ B1 y NF- κ B2 se sintetizan como precursores (p105 y p100) y se

procesan proteolíticamente a las subunidades de NF- κ B, p50 y p52 respectivamente [213, 214].

A diferencia de los otros miembros de la familia las subunidades p50 y p52 de NF- κ B no contienen dominios de transactivación. No obstante, las subunidades p50 y p52 desempeñan un importante papel al actuar como moduladores de la especificidad de la función de NF- κ B [212].

En contraste con lo que ocurre con RelA, RelB, y c-Rel, Las subunidades p50 y p52 forman homodímeros que funcionan, en general, como represores, ambos participan en la activación de genes diana formando heterodímeros con RelA, RelB, o c-Rel [215]. Además, los homodímeros p50 y p52 pueden funcionar como activadores transcripcionales cuando forman complejos con la proteína nuclear Bcl-3 [216-218].

En células no estimuladas, los dímeros de NF- κ B residen en el citoplasma, donde se encuentran secuestrados por una familia de inhibidores, llamados inhibidores de κ B (I κ B). Los I κ B más importantes son I κ B α e I κ B β . Estos inhibidores se caracterizan por contener múltiples repeticiones de anquirina. Éstos dominios permiten a los inhibidores I κ B enmascarar a la secuencia de localización nuclear (NLS) de las proteínas NF- κ B, manteniéndolas así secuestradas en el citoplasma en un estado de inactivación [219]. Curiosamente, p105 y p100, los precursores de también contienen repeticiones de anquirina, que se cortan al madurar a p50 y p52, actuando como sus propios inhibidores internos [212].

Existen dos vías principales de señalización, las vía canónica o clásica y la vía alternativa de NF- κ B [63].

En la vía clásica / canónica, el NF- κ B se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B α . La activación de receptores de membrana, como los TLR, o receptores de citoquinas proinflamatorias como TNF e IL-1, induce la activación del complejo I κ B quinasa (IKK). La IKK, a su vez, fosforila a la proteína I κ B α , lo que causa la disociación del complejo I κ B α - NF- κ B. A su vez, I κ B α es ubiquitinada y degradada por el proteasoma. NF- κ B, ya libre de inhibidores, entra al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN, llamadas elementos de respuesta (RE). De este modo NF- κ B es capaz de inducir la transcripción de genes específicos, como los de TNF e IL-1 β , que amplifica aún más la activación de NF- κ B. de proteínas específicas, provocando un cambio en la función de la célula [63, 220]. La vía clásica juega un papel clave en las respuestas inmunitarias innatas, induce la expresión de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, y de este modo amplifica la respuesta inflamatoria.

Algunos estímulos, entre los que se encuentran linfotoxina- α , BAFF o RANKL, activan a NF- κ B a través de una vía alternativa. En esta vía, tras la activación del receptor, se activa la quinasa NIK (*NF- κ B inducing kinase*), que induce la fosforilación del precursor de NF- κ B2 p100, con el consiguiente procesamiento por la proteasoma y la liberación de la subunidad p52 madura. Todo ello ocurre sin la participación de IKK. A continuación, p52 forma un dímero con RelB, y migra al núcleo para ejercer su actividad induciendo la expresión de una familia de genes diferentes a los expresados por la vía clásica [221].

Se ha sugerido que, en la inflamación, la vía alternativa de NF- κ B tiene un papel importante en la estimulación de órganos linfoides y de la inmunidad adaptativa [222].

En la pancreatitis aguda la respuesta inflamatoria pancreática y extrapancreática más pronunciada es impulsada por NF- κ B [223].

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, entre 5-20 kDa, capaces de modular la actividad funcional de un amplio espectro de células diana, uniéndose a receptores específicos de su membrana celular [224]. La familia de las citoquinas incluye a las interleuquinas, quimioquinas, interferones, factores estimulantes de colonias y muchos factores de crecimiento. Entre las funciones de las citoquinas se encuentra la comunicación intercelular, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Además, tienen otras funciones entre las que se encuentran la regulación de la embriogénesis, de la angiogénesis y de procesos neuroendocrinos.

Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por otros tipos celulares entre los que se encuentran los leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, adipocitos, miocitos y fibroblastos. Las citoquinas actúan regulando las respuestas inmunitarias del hospedador a la infección, inflamación y trauma; actuando incluso a concentraciones extremadamente bajas [224].

En general, las citoquinas tienen efectos pleiotrópicos, es decir que ejercen múltiples efectos en distintos tipos celulares, además existe una gran redundancia entre las citoquinas, muchas de ellas tienen efectos biológicos similares, lo cual se explica en parte porque muchas comparten receptores o emplean factores de transcripción comunes. Sin embargo, debe destacarse que casi todas las citoquinas

tienen al menos algunas propiedades singulares [224]. Las citoquinas se unen a receptores celulares específicos, induciendo respuestas específicas a través de la señalización intracelular [225-227]. Muchas citoquinas pueden actuar como proinflamatorias o antiinflamatorias en diferentes circunstancias [228].

Debido a estas características es difícil clasificar a las citoquinas según su actividad funcional, aunque se puede realizar una clasificación según su función más importante:

- Citoquinas proinflamatorias. Tienen un papel clave en la inflamación. Entre ellas se encuentran IL-1b, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-12, IL-18, producidas principalmente por monocitos y macrófagos; y quimiocinas inflamatorias con capacidad de atraer leucocitos al foco de inflamación como IL-8, RANTES, MIP, MCP; o IL-2, IL-15, IL-16, IFN- γ producidas por los linfocitos durante la respuesta inmunitaria adaptativa.
- Citocinas antiinflamatorias. Actúan como factores antiinflamatorios e inmunosupresores. Son producidas principalmente en la respuesta inmunitaria adaptativa por los linfocitos TH2. Entre ellas se encuentran la IL-4, IL-10 y TGF- β .
- Citoquinas implicadas en la hematopoyesis. Producidas principalmente por linfocitos activados y por las células pluripotenciales de la médula ósea. Entre ellas se encuentran IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, GM-CSF, G-CSF.

Las citoquinas proinflamatorias favorecen el desarrollo del proceso inflamatorio mediante el estímulo de la proliferación y diferenciación de células del sistema

inmunitario, o a través de la inducción de la secreción de otras citoquinas proinflamatorias. Han sido descritas un amplio número de citoquinas proinflamatorias, las cuales son sintetizadas principalmente durante la respuesta inmunitaria innata por monocitos y macrófagos, o por linfocitos TH1 activados durante la respuesta inmunitaria adaptativa. La producción de citoquinas proinflamatorias no está restringida a las células antes mencionadas, sino que también son sintetizadas por linfocitos NK, células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos, y células tisulares de músculo esquelético, hígado y pulmón. Las citoquinas proinflamatorias que tienen un mayor papel en los procesos inflamatorios son IL-1, IL-6, TNF- α y las quimiocinas inflamatorias: IL-8, RANTES y MCP-1.

Las citoquinas antiinflamatorias actúan regulando negativamente el desarrollo del proceso inflamatorio mediante dos mecanismos: la inhibición del crecimiento y la diferenciación de las células del sistema inmunitario, y a través de la reducción de la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Además, éstas citoquina activan las funciones de los linfocitos B. Algunas de las citoquinas que en la actualidad se consideran más importantes son las interleuquinas IL-4, IL-10, IL-13, el factor estimulante de colonia granulocitos (G-CSF), entre otras.

Interleuquina-1 β (IL-1 β): Pertenece a la familia de Interleuquina-1, un grupo de 11 citoquinas que tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmunitaria. Es sintetizada fundamentalmente por monocitos. IL-1 α y IL-1 β son los dos miembros de la familia mejor estudiados, debido a que fueron las primeras en ser descritas y a que son las que tienen un efecto proinflamatorio más potente. Tienen un antagonista natural, IL-1Ra (Antagonista del receptor de IL-1). Los tres

comparten en su estructura un dominio en lámina β . La señalización es a través del receptor de IL-1 (IL-1R), y la proteína adaptadora MyD88 participa en la ruta de señalización. IL-1Ra regula la actividad proinflamatoria de IL-1 α y IL-1 β compitiendo con ellas por los sitios de unión al receptor IL-1R [229-231].

La IL-1 es producida por macrófagos tisulares, monocitos, fibroblastos y células dendríticas, pero también por linfocitos B, células NK, microglía y células epiteliales. Entre sus efectos se encuentra el inducir la liberación de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el sitio de la inflamación, además promueve el aumento de expresión de factores de adhesión en las células endoteliales, lo que aumenta la diapédesis de células inmunitarias al foco de inflamación. También activa la diferenciación de las células hematopoyéticas y la síntesis de colágeno en los fibroblastos [232]. Además, promueve la síntesis de prostaglandinas, así como la de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, especialmente de la proteína C reactiva. Por lo tanto, además de fiebre, la IL-1 también causa hiperalgesia, vasodilatación e hipotensión [233, 234].

El interferón gamma (IFN γ) es una citoquina soluble, presente en forma dimérica. Es el único miembro de la familia de interferones de tipo II [235].

La producción de IFN γ se encuentra restringida a células especializadas del sistema inmunitario. Es producido por muchos tipos celulares entre los que se encuentran los linfocitos T CD4 + y CD8 + $\alpha\beta$, linfocitos T $\gamma\delta$, células NKT y células NK [236].

IFN γ modula la expresión de varias citoquinas [237]. El IFN γ induce un aumento de la expresión de IL-12, que a su vez es un regulador importante de la producción de IFN γ . La señalización de IL-12 dirige la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a linfocitos TH1, además activa a las células dendríticas, los macrófagos y las NK; para inducir una mayor secreción de IL-12, la cual promueve más diferenciación a TH1, amplificando fuertemente la reacción [237].

A su vez, IFN γ induce la represión de la producción de IL-10, una importante citoquina antiinflamatoria, para evitar la regulación negativa de la actividad inflamatoria [237].

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina clave en la primera línea de la inflamación, siendo el principal mediador de shock séptico en las infecciones bacterianas y de inflamación sistémica en variadas patologías [238]. Existen dos receptores distintos para él TNF- α ; el receptor 1 de TNF- α y el receptor 2 de TNF- α .

Es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, aunque los leucocitos circulantes y las células acinares también producen esta citoquina [239]. Induce la expresión de otras citoquinas entre las que se encuentran IL-6 e IL-8 [240], y de moléculas de adhesión celular [241].

El TNF- α induce la liberación de especies reactivas de oxígeno, con el consiguiente también daño a los capilares, que se vuelven procoagulantes y proadhesivos. En consecuencia, se recluta y activa a más neutrófilos, lo que resulta en una mayor

producción de especies reactivas de oxígeno y daño celular [241]. En conclusión, el TNF- α orquesta la propagación de la reacción inflamatoria local a sistémica.

La IL-6 es una importante citoquina proinflamatoria. Sus niveles se encuentran elevados en la mayoría, si no en todos, los procesos inflamatorios. Es sintetizada fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células hematopoyéticas. También es producida por las células del músculo liso en respuesta a una estimulación por IL-1 β y TNF- α . Entre sus efectos se encuentra el inducir la liberación de proteínas de fase aguda por parte del hígado, como proteína C reactiva (PRC), y en especial, fibrinógeno [242]. Aumenta la síntesis de IL-2, activa el desarrollo de las células hematopoyéticas y la diferenciación de linfocitos B para producir inmunoglobulinas. En el tejido inflamado induce la apoptosis de neutrófilos y el reclutamiento de monocitos/macrófagos [227, 243, 244]. La IL-6 también afecta a la actividad de los linfocitos T; induce el reclutamiento de linfocitos T, controla la proliferación y la supervivencia de los linfocitos TH1 y TH2, es un factor clave del linaje TH17 y además puede inhibir las funciones de las células T reguladoras [245].

IL-8 es una quimioquina que induce quimiotaxis de neutrófilos [246]. Se secreta principalmente por fagocitos mononucleares, pero también por otras células, como las células endoteliales, al exponerse a estímulos proinflamatorios. Induce la adhesión de neutrófilos al endotelio, y dirige su migración al tejido inflamado; y activa mecanismos efectores de neutrófilos en el tejido [246, 247]. Es digno de mención que la actividad biológica de IL-8 se relaciona más con el gradiente de concentración que con sus niveles absolutos.

La IL-18, también conocida como factor inductor del interferón-gamma es una citoquina proinflamatoria que en los humanos está codificada por el gen *IL18* [248, 249]. Pertenece a la superfamilia IL-1 y es producida por macrófagos y otras células. La IL-18 funciona uniéndose al receptor de interleucina-18, y junto con IL-12 induce la inmunidad mediada por células tras la estimulación con productos microbianos como lipopolisacárido (LPS). La IL-18 induce la liberación de otra importante citoquina proinflamatoria, el IFN- γ que desempeña un papel importante en la activación de macrófagos y otras células [250]. De hecho, la IL-18 e IL-12 exhiben un marcado sinergismo en la inducción de la expresión de interferón- γ en linfocitos T [250]. Las investigaciones sobre el mecanismo de este sinergismo han revelado que IL-12 regula al alza la expresión del receptor de IL-18 en células que producen interferón- γ [250]. Aunque IL-18 no induce el desarrollo de células TH1, es esencial para la inducción y activación efectivas de células TH1 por IL-12 [250, 251]. En cuanto a las células NK, IL-18 parece activarlas independientemente de IL-12 [251]. Aunque IL-12 e IL-18 activan tanto la inmunidad innata como la adquirida, su producción excesiva por macrófagos activados puede inducir trastornos multiorgánicos que incluyen la alteración del sistema inmunitario[250].

RANTES (*Regulated upon activation, Normal T cell expressed and secreted*):

También llamada CCL5. Es una citoquina proinflamatoria producida por los linfocitos T estimulados por un mitógeno o un antígeno. Actúa como un agente quimiotáctico para linfocitos T, siendo la quimiocina con mayor poder de atracción sobre los linfocitos T CD8+. CCL5 causa también la proliferación y activación de ciertas células NKs, para formar células CHAK (*CC-Chemokine-activated killer*)

[252]. In vitro es un potente atrayente de los monocitos, eosinófilos y a basófilos en los que induce la liberación de histamina [253].

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): También conocida como CCL2 (*C-C motif ligand 2*). Es un miembro de la familia de quimioquinas clase C – C, de la familia de quimiocinas beta [254].

MCP-1 es uno de los factores clave involucrados en el inicio de la inflamación. Es un potente quimioatrayente de neutrófilos, desempeñando un papel fundamental en el tráfico de macrófagos y monocitos hacia los sitios de inflamación [254, 255]. Ha sido implicado en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, nefropatía diabética, artritis reumatoide y varias enfermedades infecciosas [255, 256].

La expresión de MCP-1 está regulada a nivel transcripcional por agentes estimulantes como TNF- α , IFN- γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factores de estrés [254]. Por el contrario, el ácido retinoico, los glucocorticoides y el estrógeno inhiben la expresión de MCP-1 [257] En muchas de estas respuestas reguladoras, el factor de transcripción proinflamatorio del factor nuclear kappa B (NF-B) es un mediador clave [254].

La IL-10 es producida principalmente por los monocitos tras la activación de PD-1 [258]. La expresión de IL-10 es muy baja en tejidos no estimulados, y parece ser necesaria la estimulación de la microflora comensal para su producción [259]. Aunque se considera una citoquina antiinflamatoria, la IL10 puede tener efectos pleiotrópicos, y ejercer efectos antiinflamatorios y proinflamatorios. Entre los efectos proinflamatorios se encuentra la reducción de la expresión de MHC clase II, el aumento del tiempo de supervivencia de los linfocitos B y el bloqueo de las vías

de señalización NF- κ B y JAK- STAT [260]. Parece ser que actúa promoviendo los mecanismos efectores locales, como la activación de células NK y la estimulación de la expresión de moléculas citotóxicas [261]. Varios estudios en PA han mostrado que la IL10 se encuentra elevada en fases muy tempranas de la enfermedad, que puede usarse para predecir el desarrollo de fallo orgánico [19, 262]. Además, la IL10 se encuentra elevada junto con las de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL6 e IL8 [263].

La IL-5 es una citoquina producida principalmente por los linfocitos TH2 activados y los mastocitos. Es la principal citoquina que induce la diferenciación de los progenitores de eosinófilos, además de mejorar la capacidad efectora de los eosinófilos maduros [264]. Otras funciones de la IL-5 son estimular el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Se ha descrito que, con una adecuada estimulación, las células NK pueden producir IL-5 [265], así como las células estromales de médula ósea [266].

La IL-5 ha sido asociada desde hace tiempo con la inmunopatogenia de varias enfermedades alérgicas, como la rinitis alérgica y el asma, en las que se ha observado un gran aumento en el número de eosinófilos circulantes, en el esófago y el tejido respiratorio de esófago inducidos por esputo e inducidos por el tejido respiratorio [267]. Es por ello que se ha especulado que los eosinófilos tienen un papel importante en la patología de esta enfermedad [268].

G-CSF o Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos. Es un regulador crucial de la producción de neutrófilos [160]. Actúa prolongando la supervivencia de neutrófilos y sus precursores. En los neutrófilos maduros, el G-CSF estimula las

funciones clave, como la producción de superóxido y la fagocitosis [269]. Además de en los neutrófilos, el G-CSF también influye en las funciones de las células dendríticas y de los linfocitos T. G-CSF está considerada como una citoquina antiinflamatoria. Actúa inhibiendo la producción o actividad de varios mediadores inflamatorios muy importantes, entre los que se encuentran IL-1, TNF- α , e IFN- γ [270]. También induce un aumento de la producción de IL-4, con actividad antiinflamatoria, por parte de los linfocitos T activados [271]. G-CSF por tanto, estimula la producción de neutrófilos al tiempo que mantiene bajo control la respuesta inflamatoria [270].

La interleuquina 4 (IL-4) es una citoquina antiinflamatoria que induce la diferenciación de los linfocitos T naïve (células Th0) a linfocitos TH2. Es producida principalmente por linfocitos TH2, pero también por mastocitos, basófilos y células de la médula ósea [272]. Tras la activación por IL-4, los linfocitos TH2 producen IL-4 adicional en un ciclo de retroalimentación positiva [273]. Estudios recientes sugieren que los basófilos pueden ser la célula efectora que inicia el ciclo de retroalimentación positiva mediante la producción de IL-4, lo que induce la diferenciación de TH2 [273]. La IL-4 estrechamente relacionada y tiene funciones similares a la IL-13 con la que comparte un 25 por ciento de secuencia [274].

La IL-4 es una citoquina muy pleiotrópica. Además de su papel en la estimulación de la diferenciación de linfocitos T a linfocitos TH2, actúa inhibiendo la producción de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ e IL-2 por los linfocitos TH1 [275]. Pero además tiene también actividad inmunosupresora ya que inhibe la actividad de células NK y de macrófagos [276, 277].

La interleucina 13 (IL-13) es una citoquina, que participa en la regulación de respuestas inmunitarias e inflamatorias, y que en los humanos está codificada por el gen *IL13* [41, 278, 279] El gen *IL-13* se encuentra en el cromosoma 5q31, con una longitud de 1.4 kb *IL13* [41]. La proteína tiene una masa de 13 kDa y su estructura tiene 4 hélices alfa [280]. La estructura secundaria de la IL-13 es similar a la IL-4; sin embargo, solo tiene un 25% de homología de secuencia [274]. [

Es secretada por células T helper tipo 2 (TH2), linfocitos CD4, linfocitos T, células NKT, mastocitos, basófilos, eosinófilos y células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) [280]

La IL-13 induce en las células inmunitarias efectos que son similares a los de la IL-4, con la que está estrechamente relacionada [41]. Pero, además, la IL-13 es un mediador importante de los cambios fisiológicos inducidos por la inflamación alérgica en muchos tejidos [41]. Es un mediador de la inflamación alérgica y diferentes enfermedades, incluido el asma [280].

Al igual que IL-4, la IL-13 tiene propiedades antiinflamatorias [41]. Induce cambios en las células hematopoyéticas, aunque no son tan importantes que los de la IL-4 [41].

Células de la inmunidad adaptativa en la inflamación

Linfocitos

Los linfocitos incluyen a los linfocitos T y B, además de a las células asesinas naturales "*Natural Killer*" (NKs). Mientras que los linfocitos T y B participan en las respuestas del sistema inmunitario adaptativo, las células NK participan tanto en

las respuestas innatas como en las adaptativas. La mayoría de los linfocitos circulantes son linfocitos T.

Los linfocitos T y los linfocitos B se encuentran mayoritariamente en órganos y tejidos especializados como el timo y la médula ósea, donde se diferencian los linfocitos T y B respectivamente, y actúan en los órganos linfoides secundarios como el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos linfoides asociados a las mucosas.

Los linfocitos B constituyen entre el 5 y el 15% del total de linfocitos. Son los responsables de la respuesta inmunitaria humoral. Reconocen al antígeno tras su unión al receptor BCR (receptor de linfocito B). Cuando un linfocito B reconoce a un patógeno a través del BCR, lo fagocita, procesa y presenta péptidos del patógeno en su superficie asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Los linfocitos T colaboradores reconocen estos péptidos presentados a través de MHC de clase II, liberando citoquinas que activan al linfocito B, induciendo la proliferación y diferenciación en células plasmáticas. A ésta se le conoce como respuesta T dependiente. Algunos antígenos son capaces de generar respuestas T-independientes, por ejemplo, bacterias que muestran epítomos repetitivos de carbohidratos que estimulan a los linfocitos B a través de los PRRs.

Las células plasmáticas maduras generan y segregan inmunoglobulinas, las cuales, uniéndose al patógeno, lo opsonizan para que de este modo pueda ser reconocido por los fagocitos a través de los receptores para el fragmento Fc (FcR) de las inmunoglobulinas [156]. Los linfocitos B sintetizan citoquinas que son capaces de atraer hacia el foco de la inflamación a otros tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria.

Los linfocitos T se producen en la médula ósea y maduran en el timo, diferenciándose en linfocitos T colaboradores CD4+, o bien en linfocitos T citotóxicos CD8+. Los linfocitos circulan por la sangre y el sistema linfático hasta que son activados al contactar con un antígeno específico a través del TCR (receptor de linfocitos T) de su superficie. Los linfocitos T CD4+ reconocen péptidos presentados a través de moléculas de MHC de clase II, mientras que los linfocitos CD8+ reconocen péptidos presentados a través de moléculas de MHC de clase I. Dependiendo del tipo de célula presentadora de antígeno y de las citoquinas presentes en el sitio de encuentro con el antígeno, las células T CD4+ vírgenes se diferencian en poblaciones distintas (TH1, TH2, TH17 o TH9) que secretan diferentes perfiles de citoquinas, aunque es posible la superposición de perfiles de expresión de citoquinas [281]. Una pequeña población de linfocitos T reguladores, participa activamente en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria [282].

Este reconocimiento activa a los linfocitos T que se diferencian para llevar a cabo funciones efectoras. Los linfocitos T activados migran al sitio de infección, donde las células T CD4+ mejoran la respuesta de las células B y T y las células T CD8+ eliminan los patógenos intracelulares al matar las células diana infectadas [281]. Durante la PA, los linfocitos T CD4+ tienen un importante papel en la activación de macrófagos, además de ejercer efectos citotóxicos directos sobre las células acinares [283].

Las células asesinas naturales (células NK) son un grupo de linfocitos citolíticos, distintos de los linfocitos B y linfocitos T. También funcionan como células reguladoras que interactúan con células dendríticas, macrófagos, células T y células endoteliales [156]. Las células NK participan tanto en la inmunidad innata

como en la inmunidad adaptativa. Tienen como función eliminar ciertas células mutantes, células infectadas por virus y células que carecen de moléculas MHC-I en su superficie [284].

Las células NK desempeñan un papel crítico en la defensa temprana contra los agentes infecciosos [284]. En la PA grave se ha observado una disminución de las células NK circulantes [284].

Diferenciación de los Linfocitos T CD4

En 1986, se publicó un importante trabajo que clasificaba a los linfocitos T en células TH1 y TH2, de acuerdo con la producción de diferentes perfiles de citoquinas y la expresión de marcadores de superficie [285]. Desde entonces han sido identificados cinco subconjuntos principales en los linfocitos T naïve pueden desarrollarse: TH1, TH2, TH17, TFH y células T reguladoras inducidas (células iTreg). Cada uno de ellos se asocia con distintas señales que inducen su formación, diferentes factores de transcripción que impulsan su diferenciación, y citoquinas y marcadores de superficie que definen su identidad.

Las células TH1 son importantes para la inmunidad antiviral y antibacteriana, y se caracterizan por la producción de las citoquinas IFN- γ , IL-2 y TNF- α [286]. Las células TH1 aumentan la expresión de los receptores *Toll-like* (TLR), promueven el cambio de clase de inmunoglobulina G (IgG) , favorecen la presentación de antígenos a través del complejo de mayor de histocompatibilidad (MHC) , además de influir en la expresión de más de 200 genes cuya importancia funcional sigue siendo desconocida [287]. El IFN- γ , la citoquina característica de la población TH1,

es una potente citoquina proinflamatoria que desempeña funciones cruciales en la inmunopatología de diferentes estados autoinmunes [287].

Por el contrario, el subgrupo de células TH2 produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25. Las células TH2 induce la producción de anticuerpos, la activación y el reclutamiento de eosinófilos y la inhibición de varias funciones de macrófagos [287]. También defienden al huésped contra los parásitos extracelulares, incluidos los helmintos, así como los implicados en la inducción y la persistencia de diversas enfermedades alérgicas y atópicas. [286, 287]

La dicotomía del eje TH1/TH2, se rompió tras la identificación de otros dos subconjuntos, las células TH17 y las células Treg [288] . Las células T reguladoras se identificaron por primera vez en 1995, como una población de linfocitos T inmunosupresores, que expresan CD25 de manera constitutiva[286, 289].

Las células TH17 son críticas para las respuestas antifúngicas y para la defensa contra las infecciones bacterianas; además, las células TH17 son abundantes en el intestino para ayudar a regular la microbiota intestinal [287]. Se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ t (*retinoid related orphan receptor- γ t*), y por la expresión de las citoquinas IL-17A, IL-17F e IL-22 [286, 287].

Otro subconjunto de linfocitos T colaboradores, lo componen las células T foliculares (TFH), que promueven la inmunidad humoral dentro de los centros germinales (GC). Estas células producen IL-21, que es fundamental para la estimulación de los linfocitos B. Se caracterizan por la expresión de CXCR5 (receptor de quimiocinas CXC tipo 5) y la coexpresión de PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) y / o ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*) [286] Las células TFH

también pueden producir IL-4, que es importante para el cambio de clase de inmunoglobulina en los linfocitos B [286].

Respuesta inflamatoria sistémica

La gravedad de un episodio de PA viene determinada, no por el daño pancreático, sino por el grado de reacción inflamatoria y la respuesta del hospedador. En la actualidad, se piensa, que la muerte de células acinares causada por la activación prematura de tripsinógeno y la activación de NF- κ B en dichas células son dos eventos que ocurren de forma paralela en fases tempranas de la PA, induciendo inflamación pancreática. [61, 63]. La vía de señalización NF- κ B induce la producción de citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentran TNF α e IL-1 β , que después activan otras vías de señalización, como STAT1, STAT3 y MAPK [290, 291]. La muerte de células acinares casusa la liberación de DAMP muy inmunogénicos, que contribuyen a amplificar el proceso inflamatorio. [155]. La liberación de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas conduce a la activación del endotelio y el reclutamiento secuencial de neutrófilos, monocitos / macrófagos y linfocitos; que infiltran el páncreas y el tejido peripancreático. Las células inflamatorias presentes en el páncreas, en especial los macrófagos, producen a su vez más citoquinas, que a su vez inducen la infiltración por leucocitos adicionales, que más tarde son seguidos por el reclutamiento de leucocitos en órganos distantes, como el pulmón [292]. Las citoquinas proinflamatorias también activan a los macrófagos presentes en tejidos de órganos remotos (como el peritoneo, el hígado y los pulmones), que a su vez producen citoquinas proinflamatorias, lo que contribuye a la progresión sistémica de la PA [293].

El sistema inmunitario posee mecanismos para resolver la inflamación local, pero si no tiene éxito, la PA progresa rápidamente a una enfermedad sistémica. El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés), es una complicación de la PA potencialmente letal [260], que desencadena una compleja cascada inflamatoria que involucra una liberación excesiva de mediadores proinflamatorios, que incluye a IL1, IL6, IL8, factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros [260]. En la PA grave, la magnitud de la respuesta inflamatoria sistémica es comparable a la observada en sepsis bacteriana, con similares síntomas clínicos y patrón de citoquinas en suero [294, 295].

El proceso de retroalimentación positiva que promueve la amplificación de una respuesta local en una respuesta sistémica implica la activación extrapancreática de NF- κ B y otras vías de señalización, la producción sistémica de citoquinas proinflamatorias y la infiltración excesiva de neutrófilos en órganos remotos [63, 262]. La infiltración excesiva e incontrolada de neutrófilos conduce a la acumulación de metabolitos tóxicos que inducen la muerte celular y el daño a las células endoteliales vasculares.

Posteriormente, se produce un aumento de la permeabilidad vascular, lo que resulta en la acumulación de líquido tisular y edema [262]. Junto con alteraciones microvasculares (por ejemplo, vasoconstricción, perfusión inadecuada y aumento de la viscosidad sanguínea), el exceso de líquido tisular conduce a la falta de oxígeno, lo que produce disfunción y lesión de los tejidos distales [296].

Aunque al inicio de la PA es un trastorno estéril en la fase temprana [297], el aumento de la permeabilidad intestinal puede permitir la translocación de bacterias y la entrada de endotoxinas a la circulación. Esto puede causar la infección del páncreas necrótico, o incluso sepsis [77, 262]. Además de la activación de las vías inflamatorias, los daños en la PA se producen por alteraciones importantes en los sistemas cardiovascular, nervioso, hormonal, metabólicos y de coagulación [298].

Respuesta antiinflamatoria compensatoria

Desde el comienzo de la reacción inflamatoria en la PA, y simultáneamente a ésta, se produce una respuesta antiinflamatoria, para regular negativamente el proceso, lo cual está documentado por la presencia en la circulación de citoquinas pro y antiinflamatorias [96, 299]. A éste fenómeno ha sido llamado síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS) [300]. Mientras que el SIRS es una respuesta proinflamatoria que parece tener el objetivo de eliminar organismos infecciosos a través de la activación del sistema inmunitario, el objetivo del CARS es la restauración de la homeostasis a través de desactivación sistémica del sistema inmunitario [301]. Para contrarrestar la respuesta inflamatoria aguda, el sistema inmunitario está equipado para revertir este proceso a través del síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS). IL-4 e IL-10 son citoquinas responsables de disminuir la producción de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 [301].

Una respuesta antiinflamatoria excesiva puede causar inmunosupresión, que ya es posible detectar en la fase temprana de la PA grave, que puede estar relacionada

con una mayor susceptibilidad a infecciones posteriores [302, 303]. Entre los signos de deterioro inmunológico se incluye un recuento bajo de linfocitos circulantes [304, 305], defectos en la señalización de leucocitos [306-308], reducción de la expresión de HLA-DR en monocitos [142, 146] y alteración de la actividad de células T CD4 + [309, 310].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hasta la fecha existen trabajos que demuestran que durante las primeras fases del desarrollo de la pancreatitis aguda se producen elevaciones notables de muchos parámetros bioquímicos y también de citoquinas. En concreto, de estas últimas existen trabajos contradictorios acerca del papel que puedan jugar, probablemente debidas a diferencias metodológicas y procedimentales. Por otra parte, no se han establecido todavía factores definitivos tempranos que puedan predecir con seguridad el curso clínico del proceso. –

Nuestra hipótesis de trabajo establece que las citoquinas como factores centrales de la respuesta inflamatoria deben de jugar un papel esencial y podrían explicar las diferencias observadas en el curso clínico de la pancreatitis aguda. Los distintos perfiles de producción de citoquinas presentes en la sangre periférica de los pacientes, podrían explicar la intensidad del proceso inflamatorio y a la vez su modulación y resolución. Por tanto, podrían estar relacionadas con la gravedad de la condición clínica que presentan dichos pacientes.

Por otra parte, es conocido que variaciones genéticas en los componentes clave de la respuesta inflamatoria, condicionan la intensidad y duración de ésta y podrían por tanto tener impacto en la incidencia, la morbilidad y la mortalidad de la pancreatitis aguda.

En resumen, pretendemos demostrar como objetivo general, que los niveles y el perfil de producción de citoquinas en suero y el genotipado de polimorfismos genéticos relacionados con la inflamación podrían ser utilidad como biomarcadores pronósticos para esta enfermedad.

Objetivos específicos:

Estudiar los niveles de citoquinas en suero en el momento del ingreso en una serie de pacientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por pancreatitis aguda como herramienta para proporcionar información que sirva para predecir el curso de la enfermedad.

Determinar los polimorfismos genéticos de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, y su relación con los niveles de producción de citoquinas, y parámetros clínicos de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

En este estudio se incluyeron 269 pacientes diagnosticados de pancreatitis aguda, procedentes principalmente del área norte de la provincia de Granada, y que fueron ingresados en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Estos pacientes fueron reclutados en el periodo correspondiente entre junio de 2010 y junio de 2012. Los pacientes se reclutaron de forma consecutiva, evaluando a los mismos según la práctica clínica habitual. Los participantes en el estudio fueron informados y dieron su consentimiento para participar en el proyecto, que fue aprobado por el comité ético del Hospital Virgen de las Nieves (HUVN) y por su comisión de investigación.

La muestra objeto del estudio, se recogió en base a los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados de pancreatitis aguda según los criterios diagnósticos establecidos por las principales guías internacionales sobre el manejo de la enfermedad [311, 312] y que establecen que el diagnóstico de pancreatitis aguda debía estar confirmado por dos de los siguientes tres hallazgos:
 - Dolor abdominal agudo
 - Elevación de la amilasa sérica y / o lipasa por encima de 3 veces el límite superior de la normalidad
 - Hallazgos característicos de pancreatitis aguda en la tomografía computarizada o en ecografía abdominales.
- Los pacientes incluidos debían ser mayores de 18 años.

Por el contrario, los criterios de exclusión fueron la negativa a firmar el consentimiento informado, la minoría de edad, y dos o más episodios de pancreatitis aguda durante el estudio.

Se realizó una clasificación de la gravedad según el criterio de Atlanta 2012 [14], dividiendo a los pacientes en 3 categorías, pancreatitis aguda leve, grave y moderadamente grave.

- La pancreatitis aguda leve se caracteriza por la ausencia de insuficiencia orgánica y de complicaciones locales o sistémicas.
- La PA moderadamente grave se caracteriza por la presencia de insuficiencia orgánica transitoria o complicaciones locales o sistémicas en ausencia de insuficiencia orgánica.
- Los pacientes con PA grave sufren de insuficiencia orgánica persistente de más de 48 horas. La presencia de insuficiencia orgánica se evalúa de acuerdo con la Puntuación modificada de Marshall (MMS), donde una puntuación de 2 puntos o más en cualquiera de los sistemas evaluados indica insuficiencia orgánica [74].

Se realizó una revisión sistemática de las historias clínicas, a través de las cuales se recogieron datos clínicos, radiológicos y endoscópicos. Entre los datos recogidos se encuentran otras medidas de la gravedad, como los días de hospitalización, días de estancia en UCI, o la supervivencia, además de diferentes marcadores bioquímicos.

Los datos recogidos se pueden agrupar en 4 categorías:

- Clínicas y epidemiológicas: edad, sexo, antecedentes personales completos incluyendo comorbilidades, fármacos, alergias, antecedentes familiares de pancreatitis y etiología del cuadro actual.
- Analíticas: recogidas en dos momentos de la historia de la enfermedad, al ingreso y en 48 horas.
 - o Al ingreso:
 - Hemograma completo: Hemoglobina, hematocrito, leucocitos y fórmula leucocitaria, plaquetas
 - Bioquímica: Amilasa, glucosa, potasio, sodio, enzimas hepáticas, calcio, PCR, lactato deshidrogenasa, bilirrubina total, urea, nitrógeno ureico en sangre, y creatinina.
 - Gasometría venosa: pH, lactato, presión parcial de oxígeno (pO₂), presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂), y bicarbonato (HCO₃).
 - o A las 48 horas
 - Hemograma completo: Igual que al ingreso.
 - Bioquímica: Igual que al ingreso, pero añadiendo además triglicéridos, colesterol, ácido úrico y lipasa.
- Pruebas de imagen: A todos los pacientes se les realizó una radiografía de tórax al ingreso y una ecografía abdominal en las primeras 48-72 horas. En el caso de dudas diagnósticas se realizó además una TAC al ingreso. Posteriormente, aquellos pacientes que presentaron una pancreatitis aguda grave según los criterios de Atlanta 2012, o a

aquellos que no mejoraron tras los primeros días con un tratamiento conservador fueron sometidos a una TAC abdominal para evaluación de complicaciones locales.

- Scores pronósticos: BISAP y Ranson, dos scores ampliamente utilizados en pancreatitis aguda.

iii. Metodología de obtención de variables.

Mediante la anamnesis y exploración física se obtuvieron las variables demográficas y clínicas a través del facultativo de guardia especialista en Aparato Digestivo que valoró al paciente en urgencias. Se recogieron en el momento del ingreso los parámetros analíticos extraídos de rutina y el BISAP. Los datos recogidos en las primeras 48 horas de ingreso hospitalario se utilizaron para el cálculo del Ranson. Datos adicionales de pruebas de imagen y etiología del cuadro fueron igualmente recogidos a lo largo del seguimiento del paciente según práctica clínica habitual.

Las variables analíticas y de imagen fueron obtenidas según práctica clínica habitual en los momentos descritos en apartado anterior.

Con respecto a los controles, se emplearon los siguientes grupos:

Estudio de citoquinas. Para el estudio de citoquinas en suero se incluyeron los datos de niveles de citoquinas en suero de 20 pacientes sin patologías digestivas. La población control fue seleccionada de manera que fuera lo más parecida posible en cuanto a sexo y edad con los 117 pacientes incluidos en el estudio de citoquinas.

Los voluntarios sanos fueron informados y dieron su consentimiento para participar en el estudio.

Estudio del polimorfismo de *NFKB1 rs28362491*. Para el estudio de este polimorfismo de inserción/delección, se reclutó como grupo de control a 390 donantes de sangre voluntarios, del área de Granada. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los participantes.

Estudio de los SNPs *IL23R rs11209026*, *TNF rs1800629*, *RIPK2 rs42490*, *NOD2 rs9302752* y *MCP1 rs1024611*. Para el estudio de estos polimorfismos se emplearon como controles los datos de 1517 individuos sanos de ascendencia española, que fueron cedidos por el grupo del Dr. Javier Martín. Los datos referentes a este grupo de control se encuentran incluidos en la referencia [313].

EXTRACCIÓN DE ADN Y CUANTIFICACIÓN

El ADN genómico se extrajo a partir de muestras de sangre periférica total, conservada con EDTA como anticoagulante, de pacientes con EII y controles. La extracción se llevó a cabo mediante la tecnología de partículas magnéticas en el BioRobot Genovisión M-48 (QIAGEN, Hilden, Germany) con el kit de extracción MagAttract DNA Blood Mini M48 (QIAGEN, Hilden, Germany).

El kit hace uso perlas magnéticas a base de hierro recubiertas con compuestos que se químicamente al ADN. Estas partículas permiten la captura del ADN total, separándolo del resto de componentes celulares. El uso de un separador magnético facilita el enriquecimiento de ADN para la purificación.

El ADN se une a la superficie de sílice de las partículas magnéticas en presencia de un agente caotrópico. El ADN unido a las partículas magnéticas se lava de manera eficiente utilizando dos tampones de lavado diferentes. Los dos buffers de lavado utilizados, aumentan la pureza del DNA extraído. Las condiciones de lavado también aseguran la completa eliminación de cualquier contaminante residual sin afectar a la unión del ADN. Son seguidos de un tercer lavado con agua purificada, lo que mejora considerablemente la pureza del ADN.

Antes de cuantificar en ADN debe tenerse en cuenta que el arrastre de partículas magnéticas residuales puede afectar la lectura de la absorbancia a 260 nm del ADN purificado. Para evitarlo es conveniente centrifugar el ADN eluido durante un minuto a máxima velocidad, con lo que se consigue que las partículas magnéticas que pudieran estar presentes formen un pellet.

Una vez extraído el ADN, eluido en 200 μ L de agua libre de RNAsas, se cuantificó midiendo absorbancia a una longitud de onda de 260nm en NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Las lecturas de absorbancia a 260 nm deben estar entre 0.1 y 1.0 para ser precisas. Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 50 μ g de ADN por mililitro ($A_{260} = 1 \rightarrow 50 \mu\text{g} / \text{ml}$).

La pureza del ADN se determina calculando la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm, es decir, A_{260} / A_{280} . El ADN puro tiene una relación A_{260} / A_{280} de 1.7-1.9. Cuando las ratios obtenidas para una muestra se alejaron de estos intervalos se realizó una nueva extracción de ADN o se pidió nueva muestra de sangre periférica.

GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS

POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs)

El genotipado de SNPs se realizó mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR).

Se trata de ensayos de discriminación alélica, alélica empleando sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). En cada reacción se emplean dos cebadores y dos sondas, cada una de las cuales detecta variantes de una única secuencia de ADN. La presencia de dos pares de cebador / sonda en cada reacción permite el genotipado de las dos variantes posibles para cada SNP. Para cada muestra, se usa un par único de sondas fluorescentes, una marcada con VIC®, que se une al alelo 1; y otra sonda marcada con FAM®, que se une al alelo 2.

Cada sonda TaqMan está formada por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido, y un desactivador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'. La sonda TaqMan se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para escindir una sonda marcada ya hibridada a la secuencia diana.

Cada sonda TaqMan está diseñada de manera que hibride con una región específica de ADN que va a ser amplificada por un par de oligonucleótidos específicos. A medida que la Taq polimerasa sintetiza la cadena en sentido 3'-5', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda TaqMan ya hibridada al ADN. La degradación de la sonda separa el fluoróforo, rompiendo así la proximidad entre éste y el quencher, permitiendo así la emisión de fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la

cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN de interés presente en el producto de PCR. La escisión de la sonda permite la emisión de fluorescencia, que, al igual que en otros métodos de PCR cuantitativa, permite obtener una medida cuantitativa de la acumulación del producto de PCR durante cada ciclo. La gran ventaja de la sonda TaqMan es que aumenta significativamente la especificidad de la detección. La siguiente figura muestra un esquema de la reacción.

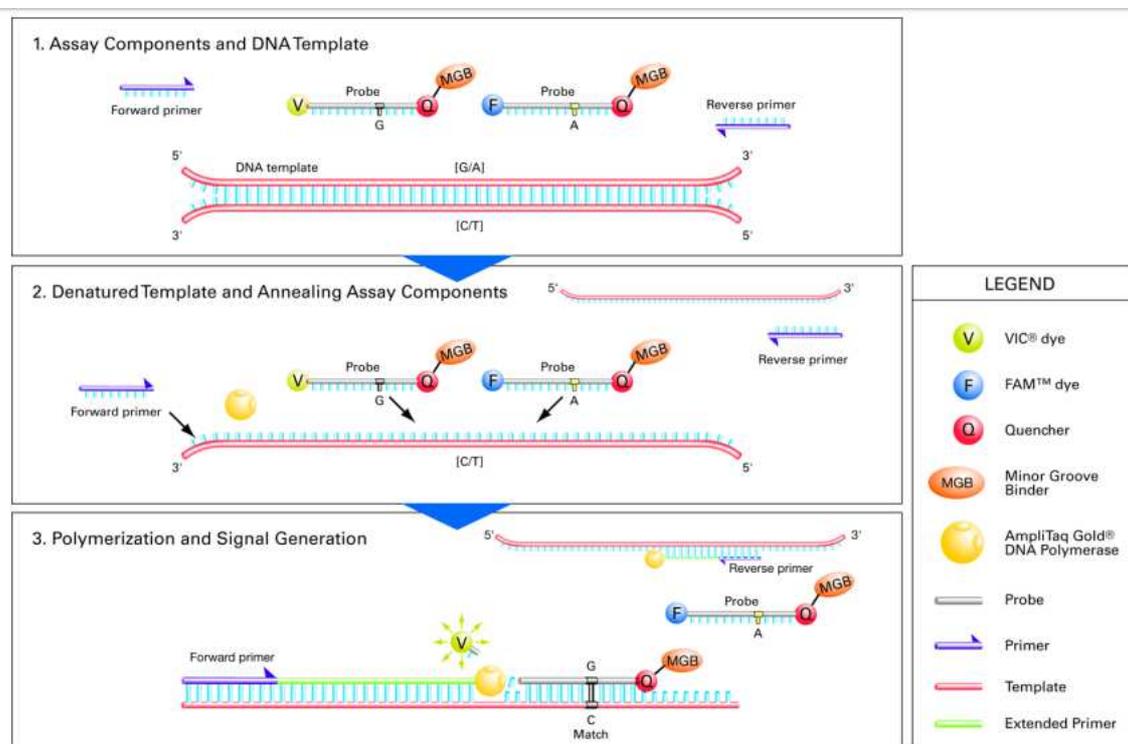


Figura 7. **Funcionamiento de ensayos TaqMan®.** Se añade ADN genómico a una mezcla de reacción que consiste en TaqMan® Genotyping Master Mix, cebadores directos e inversos y dos sondas TaqMan® MGB. Cada sonda TaqMan MGB hibrida con una secuencia complementaria, si está presente, entre los sitios de hibridación de los cebadores directo e inverso. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del quencher al fluoróforo indicador suprime la señal de fluorescencia. La actividad exonucleasa de la polimerasa escinde las sondas hibridadas con el objetivo. La escisión separa el fluoróforo informador del quencher, aumentando la señal de fluorescencia del

informador. Solo hay un aumento de la señal de fluorescencia si la secuencia diana amplificada es complementaria a la sonda. Por lo tanto, la señal de fluorescencia indica qué alelos están en la muestra.

El ensayo de discriminación alélica clasifica las muestras desconocidas como:

- homocigotos (muestras que tienen solo el alelo 1 o el alelo 2)
- heterocigotos (muestras que tienen tanto el alelo 1 como el alelo 2)

2) El ensayo de discriminación alélica mide el cambio en la fluorescencia de los colorantes asociados con las sondas. La figura en la página siguiente ilustra los resultados de coincidencias y desajustes entre las secuencias objetivo y sonda en los ensayos TaqMan® Genotyping (Livak et al., 1995).

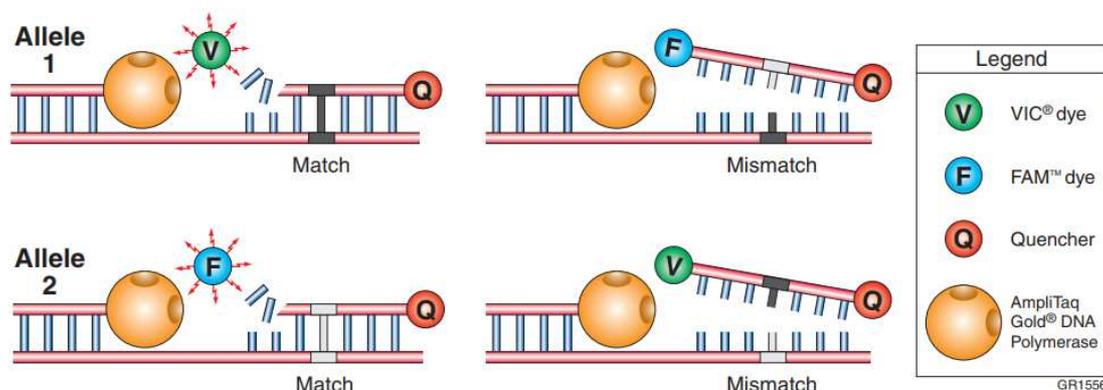


Figura 8. Ensayo de discriminación alélicas TaqMan® Genotyping. Tomado de Livak et al., 1995.

El ensayo de discriminación alélica está dividido en tres pasos.:

- Una prelectura, que sirve para determinar la fluorescencia asociada con los cebadores y las sondas antes de la amplificación.

- Amplificación del ADN mediante PCR a tiempo real (RT-PCR). Los datos recogidos durante esta fase se guardan y pueden usarse para resolver problemas si fuera necesario.
- Lectura de fluorescencia final. Toma como referencia los datos de la prelectura. A continuación, se asignan los alelos.

Para el ensayo se empleó el equipo Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en el modo estándar, placas de reacción ópticas de 96 pocillos (*MicroAmp™ Fast optical 96-well reaction plate*) y un volumen final de reacción por pocillo de 5 μ L.

Las cantidades de reactivo por muestra y pocillo se describen brevemente a continuación.

- 10 ng de ADN de la muestra diluidos en 1 μ L.
- 2.5 μ L de TaqMan® Universal PCR Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 0,25 μ L de TaqMan® Genotyping Assay Mix 20x. Contiene dos cebadores y dos sondas Taqman®-MGB específicas para cada SNP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- 1.25 μ L de agua destilada.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Preincubación a 50 °C durante 2 minutos.
- Incubación a 95 °C durante 10 minutos.
- 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, seguidos de 1 minuto a 60 °C.

Tras la finalización de la PCR a tiempo real se realizó la lectura final y se analizaron los resultados usando el programa SDS 1.3.1.

MICROSATÉLITE DE NFKB1

En este estudio se analizó un polimorfismo de inserción / deleción situado en la región promotora del gen *NFKB1*, que codifica la subunidad p105 del factor nuclear NF-kappa-B (NFKB1). Este polimorfismo es conocido como *NFKB1 rs28362491*, ó -94ins/delATTG.

Para la determinación se empleó un método basado en una PCR. Para ello se amplificó un fragmento de 289 pares de bases a partir de ADN genómico. El cebador *forward* empleado fue 5'-TTTAATCTGTGAAGAGATGTGAATG-3'; y el cebador *reverse* empleado fue 5'-CTCTGGCTTCCTAGCAGG G-3'.

Las cantidades de cada uno de los reactivos por muestra para amplificar la región de interés fueron las siguientes

- 7,5 µL de AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 0,3 µL de cebador *forward* y 0,3 µL de cebador *reverse* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 4,5 µL agua libre de nucleasas.

El cebador *forward* se encontraba marcado en su extremo 5' labeled con el marcador fluorescente 6-FAM. La presencia o ausencia de la deleción de 4 pares de bases se determinó comprobando el tamaño del amplificado en el secuenciador

ABI 3100, usando el software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

ANÁLISIS DE CITOQUINAS EN SUERO

Los niveles de citoquinas en el suero de los pacientes se determinaron mediante la realización de inmunoensayos multiplex ProcartaPlex® en la plataforma Luminex® (eBioscience, San Diego, Calif, USA). Los inmunoensayos ProcartaPlex® hacen usos de perlas marcadas con diferentes combinaciones de fluoróforos, y que están recubiertas de anticuerpos específicos. Es una modificación de la técnica de ELISA en sándwich que permite la cuantificación simultánea de hasta docenas de analitos diferentes. Un esquema general se ilustra en la figura 9.

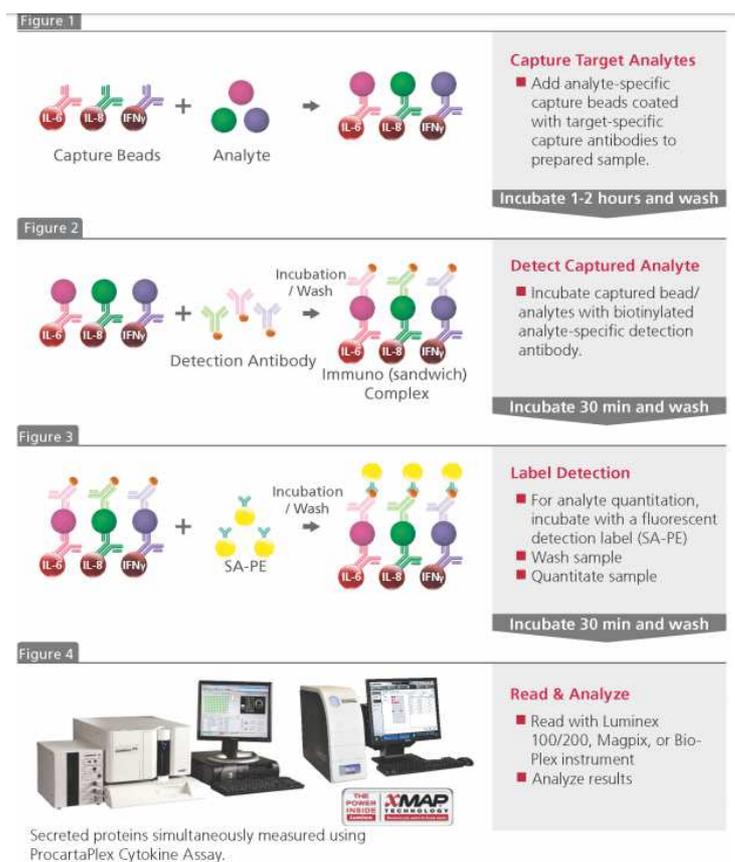


Figura 9. Ensayo de determinación de citoquinas ProcartaPlex®. Imagen extraída de la web del fabricante: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EPX180-12165-901>

Se analizaron los niveles de 12 citoquinas en suero: IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13 e IL18.

Fueron por lo tanto 12 las Interleuquinas incluidas en el estudio estadístico:

Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los resultados se analizaron con el programa ProcartaPlex Analyst Software 1.0 (eBioscience).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados se inicia con un estudio descriptivo de las variables cualitativas y cuantitativas, realizando posteriormente los análisis de comparaciones de medias y de influencia de los diversos factores considerados.

Para el estudio de las variables cuantitativas se procede a realizar el cálculo de las medidas de tendencia o posición central y de dispersión. Como estadístico de tendencia central se realizó el cálculo de la media o la mediana. La mediana es preferible cuando existe una gran dispersión de los datos analizados, como ocurre en el análisis de citoquinas en suero. En el caso del empleo de la media, el estadístico de dispersión empleado fue la desviación típica (DT), y el error típico de la media (EEM). acompañada del valor máximo y valor mínimo. Cuando se usó la mediana el estadístico de dispersión empleado fue el rango intercuartílico (RIC), definido como la diferencia entre el cuartil 75 y el cuartil 25. El RIC tiene como ventaja respecto al Rango que no se ven afectada por la existencia de valores atípicos, ya que no se calcula en función de los dos valores más extremos de la variable sino a partir de Q3 y el Q1, que son dos valores más centrados.

Para determinar si una variable cuantitativa presenta una distribución normal se empleó el test de Kolmogórov-Smirnov. En el caso de las variables cuantitativas que presentaban una distribución normal la comparación de medias se realizó mediante el test de la t de Student para muestras independientes. En caso de variables que no cumplían con los criterios de normalidad, se realizó mediante el test de la U de Mann-Whitney.

En las variables cualitativas se empleó la chi-cuadrado o el test exacto de Fisher cuando en alguna de las casillas de la tabla dos por dos había un valor menor a 5. La significación establecida para optar por la hipótesis alternativa fue en todos los casos inferior a 0,05.

Los análisis estadísticos de comparación de medias se realizaron mediante test t de Student para muestras independientes. Para las variables cuantitativas que no presentaron distribución normal, los análisis estadísticos de comparación de medianas se realizaron mediante el test U de Mann- Withney para muestras independientes y el test de Wilcoxon para muestras relacionadas. Para las variables cualitativas se han obtenido los valores de frecuencia y porcentaje. Los porcentajes se comparan entre si mediante el test exacto de Fisher para variables dicotómicas. Para cada una de estas pruebas, se rechazó la hipótesis nula cuando el valor p es menor o igual que 0,05.

Se calcularon las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) y el área bajo la curva (AUC) de las citoquinas incluidas en el estudio. Las curvas ROC son representación gráfica de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) frente a la tasa de falsos positivos (1-especificidad) para un sistema clasificador binario según

se varía el umbral de discriminación. El AUC permite establecer el potencial de cada citoquina para la predicción de gravedad en PA. Una vez calculadas las curvas ROC, se establecieron los puntos de corte a partir de los cuales se obtenía mayores cifras de sensibilidad y especificidad. Se consideró como buen predictor todo aquel que presentara una AUC > 0.5 en el límite inferior del intervalo de confianza al 95%.

Para el análisis de que citoquinas son los mejores predictores de gravedad se realizó un análisis multivariante de regresión logística binaria por pasos hacia atrás, introduciendo en primer lugar todas las citoquinas significativas a partir del análisis univariante y eliminando progresivamente las que carecían de significación estadística.

Para el estudio de asociación con enfermedad para cada uno de los polimorfismos estudiados se construyeron tablas de contingencia 2x2 y se realizó el test de χ^2 de Pearson. Se estimó la Odds Ratio (OR) y se calculó el Intervalo de Confianza (IC).

Las pruebas estadísticas de alelos, genotipos y las pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se calcularon utilizando PLINK [314]. Para las pruebas de HWE se ajustó el umbral de significación a $p < 0,05$. La existencia de posibles interacciones entre genes en la susceptibilidad a la PA se examinó utilizando las opciones *epistasis* y *fast-epistasis* de PLINK. La opción *epistasis* realiza un análisis de regresión logística para la interacción donde la agrupación de casos / controles dependientes se expresa en función de dos polimorfismos y su *término de interacción* según modelos genéticos alélicos. La opción *fast-epistasis* calcula la asociación OR entre dos polimorfismos, y su error estándar por separado en casos

y controles. La prueba de *epistasis* se basa en una puntuación estándar (puntuación Z) para la diferencia en el OR entre casos y controles.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio se realizó con el soporte del programa SPSS versión 23.0. (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA.) y de PLINK (versión 1.9, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) [314].

ASPECTOS ÉTICOS

Los procedimientos establecidos en este protocolo de estudio, relativos a la realización, evaluación y documentación, se han diseñado de acuerdo con las normas de buena práctica clínica (BPCs en la versión actual). El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la legislación y regulación aplicable.

Se obtuvo consentimiento informado de cada paciente, que fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Virgen de las Nieves. El proceso de obtención del consentimiento informado se realizó según las normas de BPCs y los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Todos los registros de identificación del sujeto han sido y serán tratados confidencialmente y, de acuerdo con las leyes y/o reglamentos aplicables, no se harán públicos. Para garantizar el anonimato de los sujetos participantes, se ha utilizado para el procesamiento de los datos sólo el número de registro e iniciales de los mismos. El tratamiento de los datos de carácter personal se llevará a cabo de acuerdo con lo dispuesto en la ley orgánica de protección de datos (Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. LOPD). La identidad de los participantes se ha mantenido confidencial en los estudios publicados.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO

Tal como se ha indicado en el apartado “Pacientes” de la sección de “Material y Métodos”, en este estudio fueron incluidos 269 pacientes diagnosticados de pancreatitis aguda, procedentes en su mayoría del área norte de la provincia de Granada, y que fueron ingresados en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves en el periodo correspondiente entre junio de 2010 y junio de 2012.

De los 269 pacientes incluidos, en 117 pacientes (51 hombres y 66 mujeres) se realizó el estudio analítico de citoquinas en suero. De estos pacientes se obtuvo una muestra de sangre venosa en las primeras 24 horas tras la admisión, que fue inmediatamente centrifugada, conservando la fracción sérica a - 80 Cº hasta el análisis.

Características clínicas del total de los pacientes incluidos en el estudio

Considerando el grupo de estudio global constituido por 269 individuos, las características clínicas que presenta se resumen en los siguientes factores:

El porcentaje de hombres y mujeres es de 47,92 y 52,8% respectivamente (Figura 10).

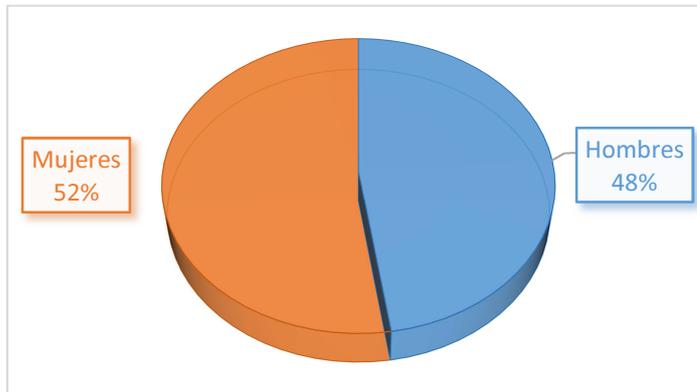


Figura 10. Distribución por sexo de los pacientes incluidos en el estudio.

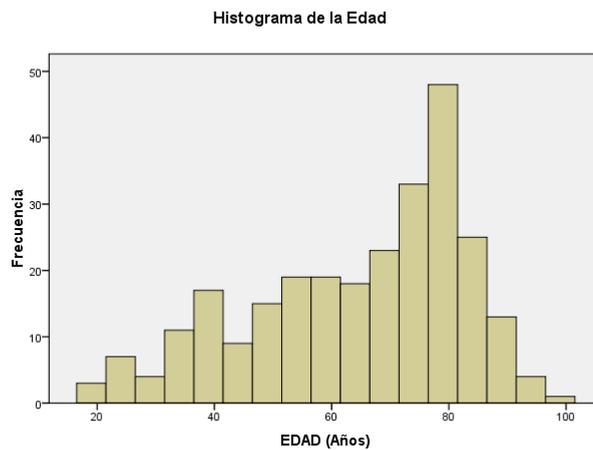


Figura 11. Histograma de edad de los pacientes incluidos en el estudio.

Cuando se analiza la distribución de la edad de los pacientes, y se aplica el test de normalidad de Kolmogórov-Smirnov y Shapiro-Wilk, se comprueba que no sigue una distribución normal ($P < 0.0001$). La edad media es de 64.58 ± 18.2 años. Al comparar la edad media de hombres (63.31 ± 18.44) y mujeres (65.7 ± 17.95) no se observan diferencias estadísticamente significativas (Figura 12).

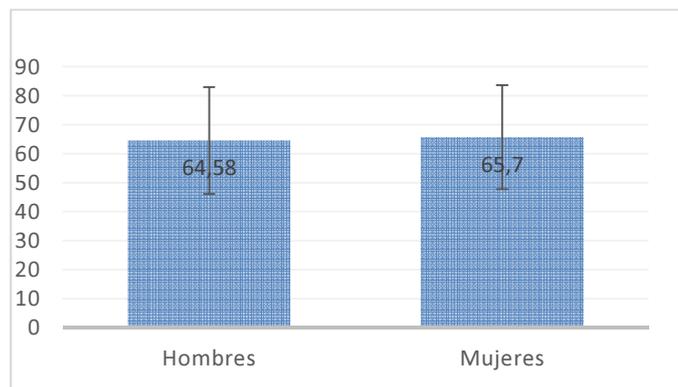


Figura 12. Edad media de los pacientes incluidos en el estudio (hombres y mujeres).

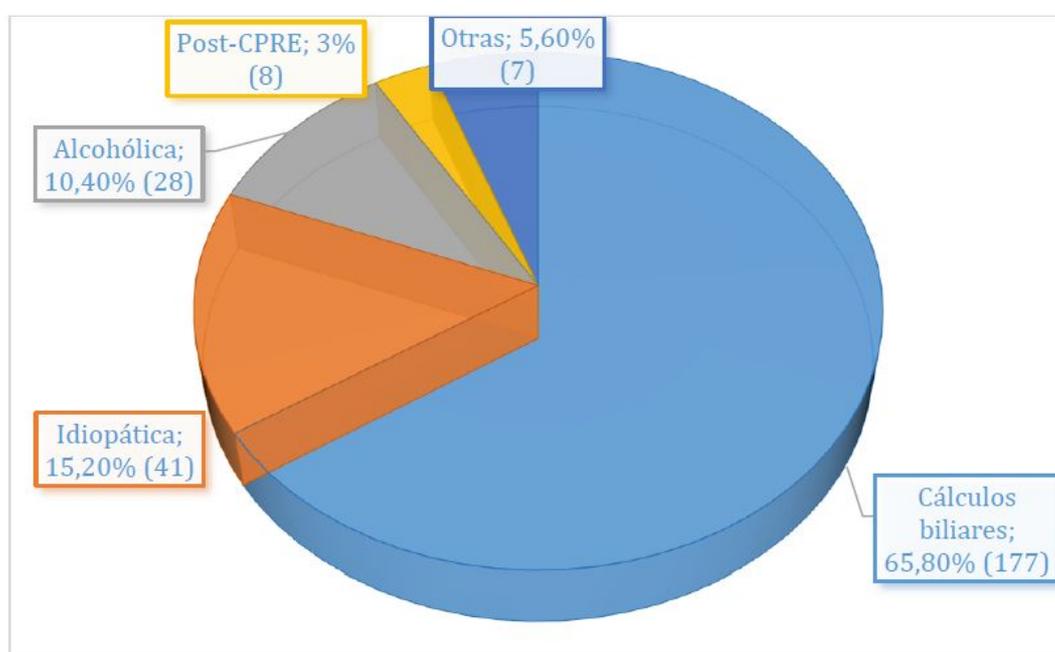


Figura 13. Etiología de los episodios de pancreatitis aguda de los pacientes incluidos en el estudio.

La etiología de los episodios de pancreatitis aguda queda definida como sigue, estando causada por cálculos biliares 177 de los casos (65,6% del total), con un origen etílico 28 de los casos (10,4% del total); y siendo 8 de los casos posteriores a la realización del procedimiento de colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), lo que supone el 3% de los casos. En 7 casos (5,6 %) la PA tuvo otro origen diferente a los detallados anteriormente. Por otro lado, en 41

casos (15.2%) de los episodios no fue posible filiar la causa de la pancreatitis aguda (Figura 13).

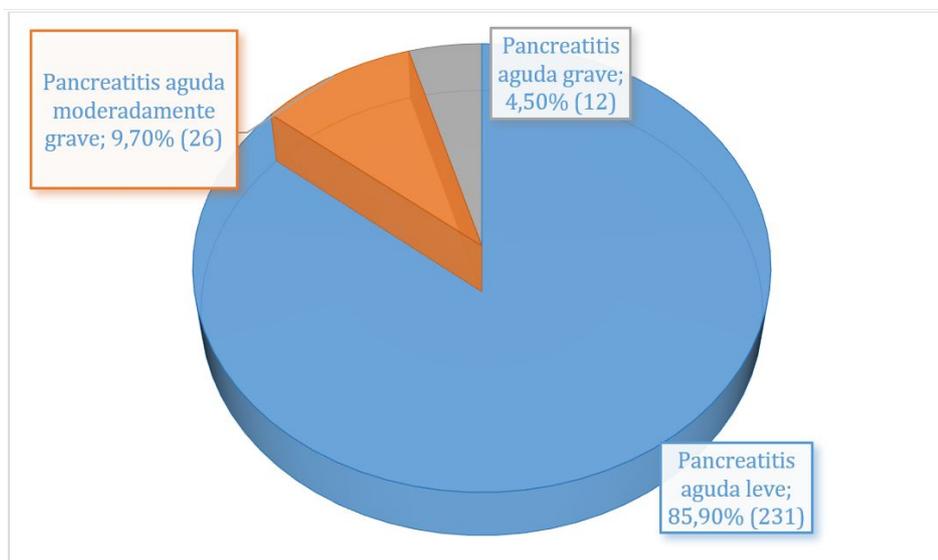


Figura 14. Clasificación de la gravedad de los episodios de pancreatitis aguda de los pacientes incluidos en el estudio según el criterio de ATLANTA 2012.

Según el criterio de Atlanta 2012 se realizó una clasificación de la gravedad [14], dividiendo a los pacientes en 3 categorías, pancreatitis aguda leve, grave y moderadamente grave. En 12 casos, un 4,5%, el episodio de Pancreatitis aguda fue clasificado como "Grave"; en 26 casos, que agrupan al 9,7% de los pacientes, el episodio fue clasificado como "Moderadamente Grave"; por último, 231 de los pacientes, que agrupan al 85,9% del total, sufrieron un episodio que puede clasificarse como "Leve".

Complicaciones locales	
<i>Colección de líquido</i>	9,3% (25)
<i>Pseudoquistes</i>	0,7% (2)
<i>Necrosis</i>	2,2% (6)
Complicaciones sistémicas	
<i>Fallo orgánico persistente</i>	14,87% (40)
<i>Exacerbación de condiciones preexistentes.</i>	15,24% (41)

Tabla 3. Complicaciones locales y sistémicas

Si entendemos por complicaciones locales y sistémicas las que se reflejan en la tabla 3, las complicaciones locales que con más frecuencia se encuentran asociadas a la PA, son las colecciones de líquido. El 9,3% de los pacientes con PA ha sufrido este tipo de complicación en algún momento. La presencia de necrosis o de pseudoquistes es mucho menos frecuente, Un 2,2 % de los pacientes desarrollo necrosis en algún momento, mientras que en sólo un 0,7% de los casos se desarrollaron pseudoquistes.

La duración media del ingreso hospitalario fue de 9,60 días (rango 2-90 días).

El 4,1% de los pacientes necesitó ser ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). La duración media del ingreso en UCI fue de 13,64 días (rango 1-37 días).

8 de los pacientes fallecieron, lo que representa un porcentaje de éxitus del 3%.

Un resumen de las características clínicas y demográficas del total de los pacientes puede ser consultado en la tabla 4.

<i>Pacientes</i>	
n	117
Edad	64,58±18,2
Hombres (%)	127 (47,92%)
Mujeres (%)	142 (52,8%)
Etnia (% Caucásicos)	97,4%
Etiología	
<i>Cálculos biliares</i>	65,8% (177)
<i>Idiopática</i>	15,2% (41)
<i>Alcohólica</i>	10,4% (28)
<i>Post-CPRE</i>	3% (8)
<i>Otras</i>	5,6% (7)
TAC	25.3%
TRM	3%
Ecoendoscopia	11,2%
Clasificación Atlanta 2012	Leve: 231 (85,9%) Moderadamente grave: 26 (9,7%) Grave: 12 (4.5%)
Ingreso en UCI	4,1% (11)
Muertes	3% (8)
Días de ingreso	9,60 (rango 2-90 días)
Días de ingreso en UCI	13,64 (rango 1-37 días)

Tabla 4. Características Clínicas y Demográficas del total de los pacientes

ESTUDIO DE CITOQUINAS EN SUERO

Se analizaron los niveles de citoquinas en suero en 117 pacientes. Como ya se ha comentado en la sección de Material y Métodos, fueron 12 las Interleuquinas incluidas en el estudio estadístico: IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13 e IL18.

En la tabla 5 se detallan los niveles de citoquinas en la cohorte de 117 pacientes.

Todas las concentraciones de citoquinas en suero están expresadas en pg/mL

Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas.

En 117 pacientes (51 hombres y 66 mujeres) se realizó el estudio analítico de citoquinas en suero. El criterio de inclusión fue la disponibilidad de una muestra de suero obtenida en condiciones estándar, es decir, en las primeras 24h tras el ingreso, con inmediata centrifugación y congelación a -80 °C.

Citoquina	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Rango Intercuartílico	Desv. Estándar
IFN γ	6.45	2.21	0,49	179,22	5.46	17,46
TNF α	4.4952	0.00	0	257,06	2.04	24,28
GM-CSF	9.44	17.16	0	48,23	48.23	9,80
IL1 β	4.41	6.05	0	16,10	5.82	3,40
IL2	3.92	0.00	0	17,97	6.68	6,80
IL4	4.53	5.59	0	19,76	6.07	3,57
IL5	0.59	0.00	0	16,40	0.00	1,97
IL6	184.83	0.00	0	9651,95	68.75	925,66
IL10	4.75	0.92	0	229,28	2.44	21,92
IL12p70	1.59	2.03	0	13,67	2.16	1,65
IL13	3.34	4.52	0	14,85	4.57	2,52
IL18	107.48	68.83	4,60	1235,41	74.80	173,12

Tabla 5. Estadísticos descriptivos de citoquinas para la totalidad de los pacientes.

Todas las concentraciones de citoquinas en suero están expresadas en pg/mL

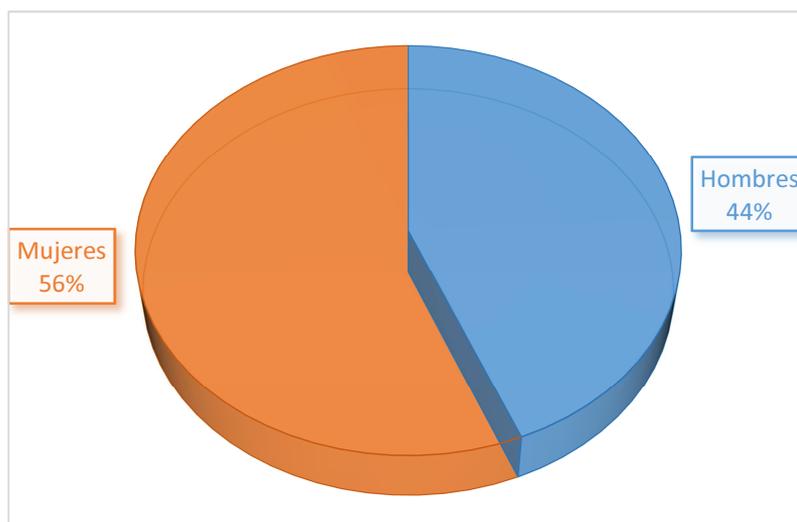


Figura 15. Distribución por sexo de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas

Considerando este grupo de estudio, las características clínicas que presenta se resumen en los siguientes factores:

El porcentaje de hombres del 43,59% y el de mujeres es el 56,41%. La edad media es de 64,16 +/- 16,7 años.

La etiología de los episodios de pancreatitis aguda en esta cohorte de pacientes se detalla en la figura 16. En 77 de los casos (65.8% del total) fue causada por cálculos biliares; 12 de los casos (10.3% del total) tienen un origen alcohólico, y siendo 3 de los casos posteriores a la realización del procedimiento de colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), lo que supone el 2,6% de los casos. En 3 casos (2,6 %) la PA tuvo origen diferente, ya fuera mixta (alcohol y cálculos biliares), metabólica, o inducida por fármacos. Por otro lado, en 17 de los casos se determinó la etiología de la pancreatitis como idiopática, lo que supone un 14,5% de los incluidos en el estudio de citoquinas.

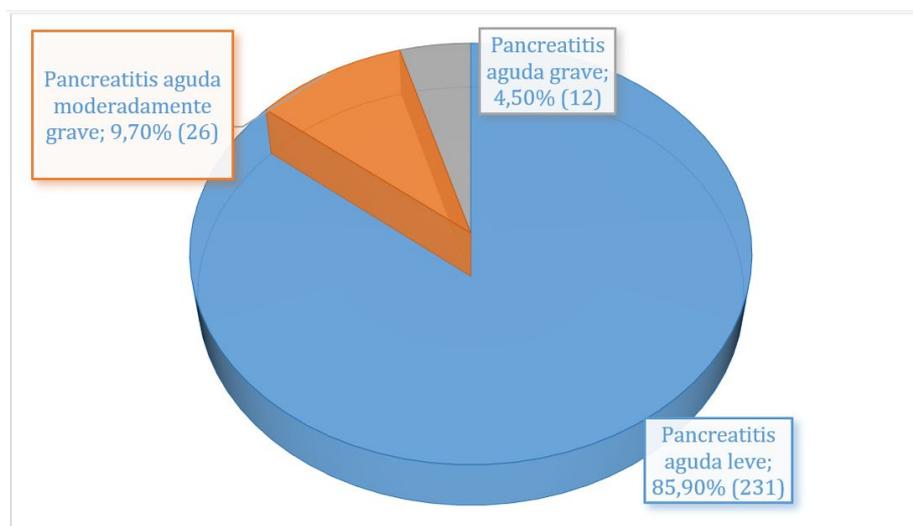


Figura 16. Etiología de los episodios de pancreatitis aguda de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas.

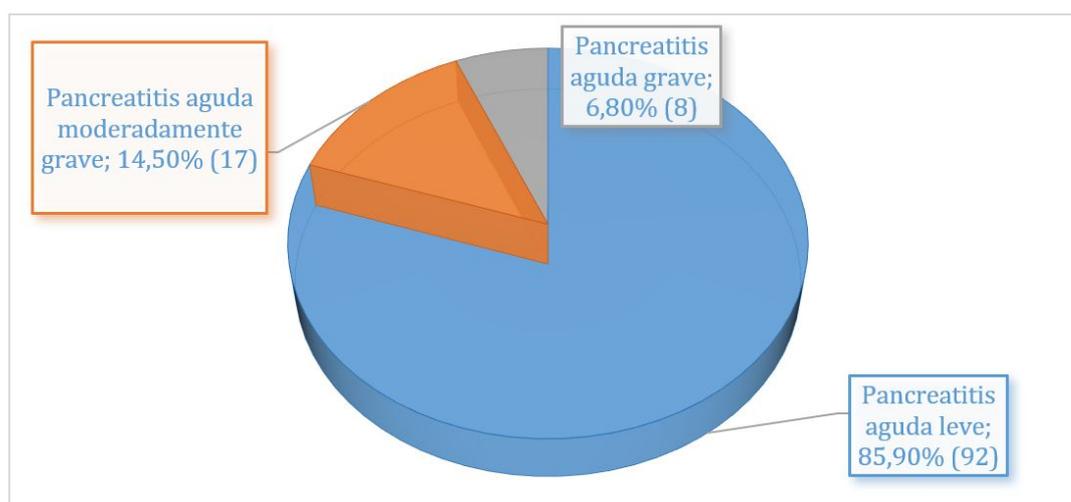


Figura 17. Clasificación de la gravedad de los episodios de pancreatitis aguda de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas según el criterio de ATLANTA 2012.

Al igual que se hizo con la totalidad de los pacientes, se realizó una clasificación de la gravedad siguiendo el criterio de Atlanta 2012 [14], clasificando a los pacientes en 3 categorías, pancreatitis aguda leve, grave y moderadamente grave.

RESULTADOS

En 8 casos, un 6,8 %, el episodio de Pancreatitis aguda fue clasificado como "Grave"; en 17 casos, que agrupan al 14,5% de los pacientes, el episodio fue clasificado como "Moderadamente Grave"; por último, 92 de los pacientes, que agrupan al 85.9% del total, sufrieron un episodio que puede clasificarse como "Leve".

El 9,4% de los pacientes incluido en el estudio de citoquinas necesitó ser ingresado en la UCI.

La duración media del ingreso hospitalario fue de 10.86 días (rango 3-90 días). La duración media de la estancia en la UCI fue de 11,89 días (rango 1-32 días).

Siete de los pacientes fallecieron, lo que representa un porcentaje del 6%.

Un resumen de las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas puede ser consultado en la tabla 6.

Pacientes	
n	117
Edad	64.16±16.7
Hombres (%)	51 (43.59%)
Mujeres (%)	66 (56.41%)
Etnia (% Caucásicos)	99.1%
Etiología	
<i>Cálculos biliares</i>	65.8% (77)
<i>Idiopática</i>	14.5% (17)
<i>Alcohólica</i>	10.3% (12)
<i>Post-CPRE</i>	2.6% (3)
<i>Otras</i>	2.6% (3)
Clasificación Atlanta 2012	Leve: 92 (78.6%) Moderadamente grave: 17 (14.5%) Grave: 8 (6.8%)
Ingreso en UCI	9.4% (9)
Muertes	6% (7)
Días de ingreso	10.86 (rango 3-90 días)
Días de ingreso en UCI	11.89 (rango 1-32 días)

Tabla 6. Características Clínicas y Demográficas de los pacientes incluidos en estudio de Citoquinas

Relación de los niveles de citoquinas con la etiología de la enfermedad

Dentro de las posibles causas de la PA se contemplan: litiásica, alcohólica, infecciosa, farmacológica, post-CPRE, metabólica, idiopática, mixta (alcohólica y litiásica) y otras. Las más comunes son litiásica y alcohólica. Una comparativa de la etiología de la enfermedad en el total de pacientes y en aquellos incluidos en el estudio de citoquinas puede ser consultada en la tabla 7.

	Total de pacientes n=317	Estudio de citoquinas n=117
	n (%)	n (%)
Litiásica	209 (65,9)	77 (65,8)
Etílica	32 (10,1)	12 (10,3)
Fármacos	3 (0,9)	1 (0,9)
Post - CPRE	9 (2,8)	3 (2,6)
Metabólica	4 (1,3)	2 (1,7)
Idiopática	46 (14,5)	17 (14,5)
Otras	9 (2,8)	3 (2,6)
Mixta (Alcohol Y Litiasis)	5 (1,6)	2 (1,7)
Total	317 (100)	117 (100)

Tabla 7. Etiología en el total de pacientes y en aquellos incluidos en el estudio de citoquinas

Con el fin de determinar si existe alguna relación entre los niveles de citoquinas y la etiología de la enfermedad se realizó un análisis mediante el test de Kruskal-Wallis para k muestras independientes y posteriormente mediante el test de U de Mann-Whitney tras la construcción de variables dicotómicas. Los resultados obtenidos indican que no hay relación alguna entre la etiología de la enfermedad y los niveles de citoquinas en suero.

Comparación de los niveles de citoquinas entre controles sanos y pacientes con pancreatitis aguda (PA)

Para el estudio de citoquinas en suero se incluyeron los datos de niveles de citoquinas en suero de 20 pacientes sin patologías digestivas. La población control fue seleccionada de manera que fuera lo más parecida posible en cuanto a sexo y edad a los 117 pacientes incluidos en el estudio de citoquinas. Los voluntarios sanos fueron informados y dieron su consentimiento para participar en el estudio

Para la realización de comparaciones entre grupos se decidió que era más conveniente utilizar como medida de centralidad la mediana que la media aritmética, ya que ésta última se ve muy alterada por valores extremos. La medida de dispersión utilizada es el Rango Intercuartílico (IQR), que es la diferencia entre el tercer cuartil (Q3) y el primer cuartil (Q1).

Se realizó el cálculo del estadístico U de Mann-Whitney, que compara una variable cuantitativa no paramétrica en dos grupos independientes. Si el $p < 0,05$ hay diferencias significativas entre ambos grupos.

Los resultados obtenidos concluyen que existe una asociación de altos niveles de IFN γ , TNF α , IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL13 e IL18 con pancreatitis aguda. Dichos resultados pueden ser consultados en la tabla 8.

Comparación de los niveles de citoquinas entre pacientes con Pancreatitis Aguda

Los pacientes fueron clasificados según su gravedad siguiendo el criterio de Atlanta 2012 [14]: leve (92 pacientes, 78.6%), moderadamente grave (17 pacientes, 14.6%) y grave (8 pacientes, 6.8%). A continuación, se compararon los niveles de citoquinas en suero en los pacientes con PA leve frente al resto de los

RESULTADOS

pacientes (PA moderadamente grave o grave); y también se compararon los niveles de citoquinas en suero en pacientes con PA grave frente al resto (PA leve o moderadamente grave).

Citoquina	Pacientes (N=117)			Controles (N=20)			P
	Media	Mediana	RIC	Media	Mediana	RIC	
IFN γ	6.44	2.21	5.46	1.54	7.685	8.66	<0.001
TNF α	4.49	0.00	2.04	1.99	1.720	2.33	0.015
GM-CSF	4.49	17.16	48.23	0.91	0.00	0.00	n. s
IL1 β	4.41	6.05	5.82	0.45	0.220	0.99	<0.001
IL2	3.92	0.00	6.68	0	0.00	0.00	n. s
IL4	4.53	5.59	6.07	2.38	1.130	5.65	0.036
IL5	0.59	0.00	0.00	0	0.000	0.00	n. s
IL6	184.83	0.00	68.75	0.80	0.000	0.00	0.001
IL10	4.75	0.92	2.44	0.98	0.420	0.72	0.002
IL12p70	1.59	2.03	2.16	1.95	1.850	1.05	n. s
IL13	3.34	4.52	4.57	0.39	0.000	0.47	<0.001
IL18	107.48	68.83	74.80	22.45	17.485	20.41	<0.001

Tabla 8. Comparación de los niveles de citoquinas en Pacientes y Controles.

P < 0.05 fue considerado significativo

Todas las concentraciones de citoquinas en suero están expresadas en pg/mL

RIC = Rango Intercuartílico; n. s=no significativo

Debido a la existencia de valores extremos es más conveniente utilizar como medida de centralidad la mediana que la media aritmética. La medida de dispersión que se utiliza es el Rango Intercuartílico (IQR).

Se ha calculado el estadístico U de Mann-Whitney, que compara una variable cuantitativa no paramétrica en dos grupos independientes. Se consideró significativo un valor de P menor a 0,05. Si el $p < 0,05$, hay diferencias significativas entre ambos grupos. En este caso, ya que ésta última se ve muy alterada por valores extremos, que es la diferencia entre el tercer cuartil (Q3) y el primer cuartil (Q1).

Como se puede consultar en la tabla 9, al comparar PA leve frente a la PA grave o moderadamente grave, se concluye que hay diferencias significativas en los niveles de 7 de las citoquinas analizadas (IFN- γ , IL6, TNF- α , GM-CSF, IL4, IL1 β , e IL13), sin que existan diferencias significativas en los niveles de las otras 5 citoquinas analizadas. Se observa que existe una asociación entre niveles elevados de IFN γ , TNF α , e IL6 con una mayor gravedad según el criterio de ATLANTA 2012. Por el contrario, niveles elevados de GMCSF, IL1 β , IL4 e IL13 están asociados a una menor gravedad.

Cuando la comparación se realiza entre los niveles de citoquinas en pacientes con PA grave, frente a los de aquellos con PA moderadamente grave o leve, se concluye que existe una asociación entre niveles elevados de IFN- γ , TNF α , IL5, IL6 e con una mayor gravedad según el criterio de ATLANTA 2012. No se observan diferencias significativas en el resto de citoquinas incluidas en el análisis.

Estos resultados se encuentran recogidos en la tabla 10.

Comparación de los niveles de citoquinas con determinadas características clínicas o analíticas

Se agruparon a los pacientes en base a determinadas características clínicas, relacionadas con la gravedad de la enfermedad, para comparar, mediante análisis no paramétricos, los niveles de citoquinas en los diferentes grupos. En el caso de que ambas variables fueran cuantitativas, se calcula el índice de correlación Tau B de Kendall, para determinar el grado de parecido o de variación conjunta existente.

Las variables relacionadas con la mortalidad que fueron analizadas son la mortalidad, los días de ingreso en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y los días totales de ingreso hospitalario.

Citoquina	PA moderadamente grave o grave (N=25)			PA leve (N=92)			P
	Media	Mediana	RIC	Media	Mediana	RIC	
IL1β	2.32	1.71	2.52	4.98	6.09	6.04	0.017
IL2	3.00	0	6.68	4.16	0	13.49	n. s
IL4	2.46	0	5.95	5.09	5.69	0.80	0.002
IL5	1.14	0	0	0.44	0	0	n. s
IL6	714.41	195.32	483.21	40.93	0	34.60	<0.001
IL10	15.24	1.37	6.69	1.90	0.84	1.98	n. s
IL12p70	1.21	0	2.72	1.70	2.03	2.11	n. s
IL13	1.52	0	2.37	3.84	4.52	0.14	<0.001
IL18	136.86	84.85	78.71	99.49	53.77	76.15	n. s
IFNγ	18.18	10.35	8.77	3.26	1.67	2.30	<0.001
TNFα	3.59	1.02	3.72	4.74	0	1.38	0.002
GM-CSF	2.36	0	0	11.36	17.16	17.54	<0.001

Tabla 9. Comparación de los niveles de citoquinas en pacientes con PA leve vs. PA moderadamente grave o grave

$P < 0.05$ fue considerado significativo

Todas las concentraciones de citoquinas en suero están expresadas en pg/mL

RIC = Rango Intercuartílico; n. s=no significativo

Citoquina	Pancreatitis grave (N=8)			Pancreatitis leve y moderadamente grave (N=109)			P
	Media	Mediana	RIC	Media	Mediana	RIC	
IL1β	2.94	2.03	4.15	4.52	6.05	6.07	n. s
IL2	3.72	0.00	7.84	3.93	0.00	6.34	n. s
IL4	4.62	3.67	6.84	4.52	5.64	6.07	n. s
IL5	2.80	0.64	2.89	0.43	0.00	0	0.025
IL6	1814.15	571.55	1667.1	65.25	0.00	43.37	<0.001
IL10	39.72	8.24	43.89	2.18	0.86	2.14	n. s
IL12p70	0.97	0.00	2.35	1.64	2.03	2.16	n. s
IL13	2.43	1.05	4.59	3.41	4.52	4.57	n. s
IL18	252.10	140.20	162.73	96.86	63.11	68.46	n. s
IFNγ	35.32	13.42	20.44	4.33	2.10	4.40	<0.001
TNFα	8.44	4.36	7.25	4.21	0.00	1.48	n. s
GMCSF	3.03	0.00	0	9.91	17.16	17.54	<0.001

Tabla 10. Comparación de los niveles de citoquinas en pacientes con PA leve vs. PA moderadamente grave o grave.

$P < 0.05$ fue considerado significativo

Todas las concentraciones de citoquinas en suero están expresadas en pg/mL

RIC = Rango Intercuartílico; n. s=no significativo

Comparación de los niveles de citoquinas entre supervivientes y fallecidos

La mortalidad es un importante marcador de gravedad. De los 117 pacientes incluidos en el estudio de citoquinas, 7 de los pacientes fallecieron, lo que representa un porcentaje de éxitus del 6%.

Tras la estratificación de los pacientes en función de la mortalidad se encontraron algunas diferencias con respecto a los niveles de citoquinas que merece la pena destacar. Observamos una asociación significativa entre los niveles de varias de las citoquinas analizadas y la mortalidad, en detalle, los niveles séricos de IFN γ , IL5, IL6, TNF α , IL18 e IL10, se encuentran significativamente elevados en el grupo de pacientes que murió. En consecuencia, y basándonos en estos datos, concluimos que existe una asociación entre altos niveles de IFN γ , IL5, IL6, TNF α , IL18 e IL10 y un mayor riesgo de fallecimiento.

Estos resultados pueden ser consultados con más detalle en la tabla 11.

	Fallecidos (N=7)			Supervivientes (N=110)			P
	Media	Mediana	RIC	Mediana	RIC		
IL1β	3.35	2.35	5.21	4.48	6.05	1.09	n. s
IL2	3.07	0	6.68	3.97	0	0	n. s
IL4	5.32	3.67	7.17	4.4805	5.61	0	n. s
IL5	3.58	1.27	6.09	0.40	0	0	0.009
IL6	1841.39	643	1043.3 3	79.41	0	195.32	<0.001
IL12p70	1.52	0	3.13	1.60	2.03	2.68	n. s
IL13	2.78	2.10	5.33	3.38	4.52	0.00	n. s
IL10	47.74	7.34	55.99	2.01	0.89	2.77	0.017
IL18	296.52	167.2	64.49	95.44	62.20	146.05	0.017
IFNγ	41.00	21.0	7.17	4.25	2.11	22.24	<0.001
TNFα	9.07	4.85	3.92	4.20	0	1.48	<0.001
GM-CSF	3.46	0	0	9.82	17.2	0	n. s

Tabla 11. Relación entre niveles de citoquinas y mortalidad en pacientes con PA.

$P < 0.05$ fue considerado significativo

Todas las concentraciones de citoquinas en suero están expresadas en pg/mL

RIC = Rango Intercuartílico; n. s=no significativo

Relación de los niveles de citoquinas con días de ingreso hospitalario y días de estancia en UCI

La duración del ingreso hospitalario, o de la estancia en UCI, son otros marcadores de gravedad que fueron tenidos en cuenta.

Se empleó el coeficiente de correlación de Kendall para determinar si existía una correlación positiva entre los niveles de citoquinas y la duración del ingreso hospitalario o de la estancia en UCI. Del análisis de los datos se desprende que existe una correlación positiva entre los niveles de algunas citoquinas (IFN γ , TNF α , IL10, e IL18) y la duración del ingreso hospitalario (Tabla 12). Además, se comprueba que hay una correlación positiva de los niveles séricos de IFN γ , TNF α , IL10, e IL6; con los días de ingreso en UCI (Tabla 12).

[Relación de los niveles de citoquinas en suero con otros parámetros.](#)

La proteína C Reactiva (PCR), la creatinina, la amilasa, y el calcio (Ca²⁺); son marcadores bioquímicos clásicos de PA.

Se estudió, mediante regresión logística, la relación entre dichos marcadores bioquímicos (medidos en las 24h tras el ingreso, y de nuevo tras 48h) con la gravedad de la PA. Cuando, mediante regresión logística, se compararon pacientes con PA leve, frente a pacientes con PA grave o moderadamente grave se encontró una correlación significativa entre niveles de PCR y gravedad (P = 0.008).

Coeficiente de correlación tau B de Kendall (τ)		
	Duración de ingreso hospitalario	Duración de Ingreso en UCI
IFNγ	0.237*	0.279*
TNFα	0.276*	0.209*
GM-CSF	-0.167	-0.140
IL1β	-0.034	-0.039
IL2	0.066	-0.002
IL4	-0.038	-0.025
IL5	0.081	0.165
IL6	0.302*	0.272*
IL10	0.185*	0.200*
IL12p70	-0.031	-0.032
IL13	-0.098	-0.070
IL18	0.171*	0.138

*Correlación lineal significativa.

Tabla 12. Correlación lineal entre niveles de citoquinas en Suero y duración de ingreso hospitalario o en UCI

		Creatinina	Calcio	Amilasa	PCR
IFNγ	<i>P</i>	< 0.001	0.003	n. s	0.004
IL13	<i>P</i>	n. s	n. s	0.033	n. s
IL1β	<i>P</i>	n. s	n. s	0.027	n. s
IL4	<i>P</i>	n. s	n. s	0.010	n. s
IL5	<i>P</i>	n. s	n. s	0.006	n. s
IL6	<i>P</i>	n. s	n. s	n. s	n. s
TNFα	<i>P</i>	0.008	n. s	n. s	0.006
GM-CSF	<i>P</i>	n. s	n. s	n. s	n. s
IL10	<i>P</i>	n. s	n. s	0.007	n. s

P < 0.05 fue considerada significativa.

Tabla 13. Relación entre marcadores bioquímicos clásicos y concentraciones de citoquinas en suero.

También se procedió al estudio de la relación entre dichos marcadores bioquímicos y los niveles de citoquinas (Tabla 13).

Nuestros datos muestran los niveles de IFN- γ están positivamente correlacionados con los de creatinina ($P < 0.001$), y proteína C reactiva ($P = 0.04$). Por el contrario, se correlacionan negativamente con los niveles de calcio ($P = 0.03$).

Los niveles de TNF α se correlacionan de forma positiva con los de creatinina ($P = 0.008$) y PCR ($P = 0.06$).

IL1 β también se correlaciona negativamente con los niveles de calcio ($P = 0.02$).

Para determinar si había una relación entre niveles de IL5 y el recuento de eosinófilos, se midieron éstos en el momento de admisión y a las 48 horas tras el ingreso.

No se relacionan los niveles de eosinófilos con los niveles de citoquinas en nuestros pacientes con PA. El recuento de eosinófilos tampoco se relaciona con la gravedad de la enfermedad según los criterios de Atlanta'12.

Análisis de curvas ROC.

Con el objeto de determinar la capacidad las diferentes citoquinas para predecir la gravedad de la pancreatitis aguda, realizamos en cálculo de las curvas ROC. A su vez, se establecieron los puntos de corte óptimos para cada ítem en términos de sensibilidad, especificidad, y AUC (Área Bajo la Curva o "*Area Under the Curve*").

A continuación, se detallan aquellas citoquinas para las que el análisis de sus correspondientes curvas ROC demostró que tenían la capacidad de actuar como predictores de gravedad.

Curva ROC de IL6

La curva ROC de IL6 (figura 10), muestra que esta citoquina puede emplearse para la predicción de pancreatitis aguda grave o moderadamente grave. Los datos muestran que valores de IL6 superiores a 52.30 pg/mL predicen PA grave o moderadamente grave con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 83% (tabla 14)

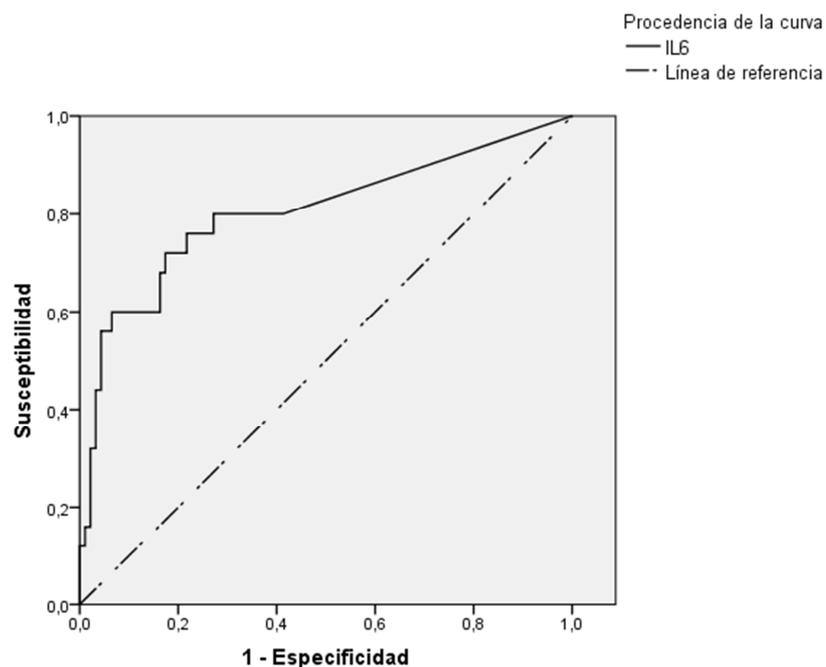


Figura 10: Curva ROC de IL6.

Punto de corte.	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
>52.30 pg/mL	0.80	72	83	<0.0001

Tabla 14. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de IL6 en la predicción de PA grave o moderadamente grave

Curva ROC de IFN γ

El análisis de la curva ROC de la citoquina IFN γ (figura 11), muestra que el análisis de dicha citoquina puede ser útil para la predicción de pancreatitis aguda grave o moderadamente grave.

Valores de IFN γ por encima de 4.47 pg/mL son predictores de PA grave o moderadamente grave, con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 81.5% (tabla 15)

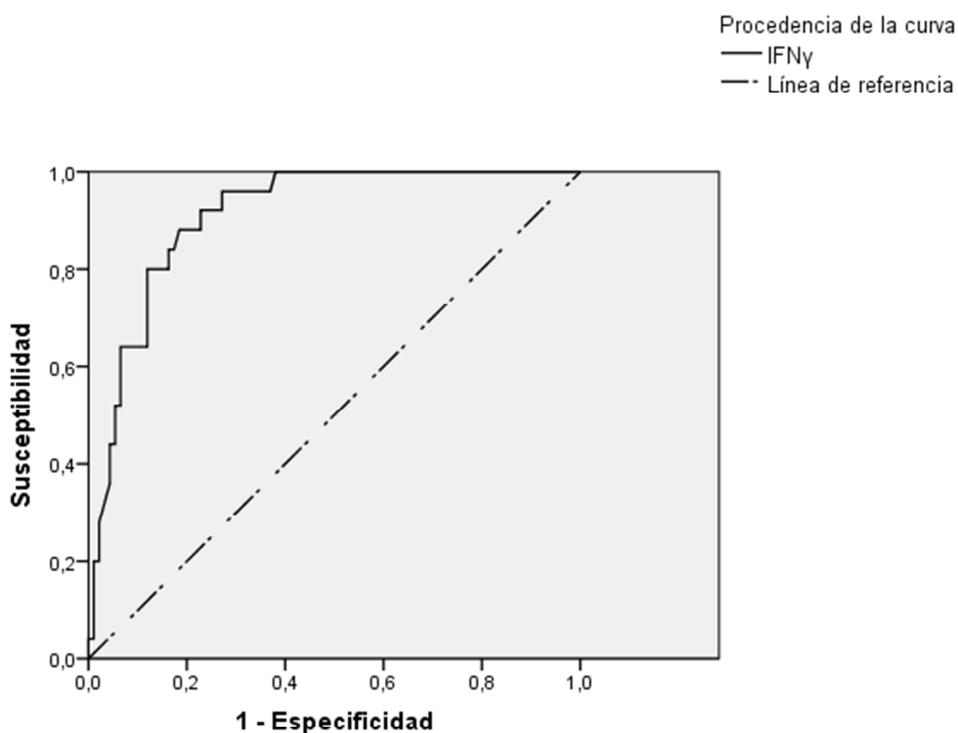


Figura 11: Curva ROC de IFN γ

Punto de corte	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
>4.47 pg/mL)	0.91	88	81.5	<0.0001

Tabla 15. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de IFN γ en la predicción de PA grave o moderadamente grave

Curva ROC de TNF α

La citoquina TNF α , puede emplearse para la predicción de pancreatitis aguda grave o moderadamente grave, como se desprende del análisis de su curva ROC (Figura X)

Los datos muestran que valores de TNF α superiores a 0.49 pg/mL predicen PA grave o moderadamente grave con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 70% (tabla 16).

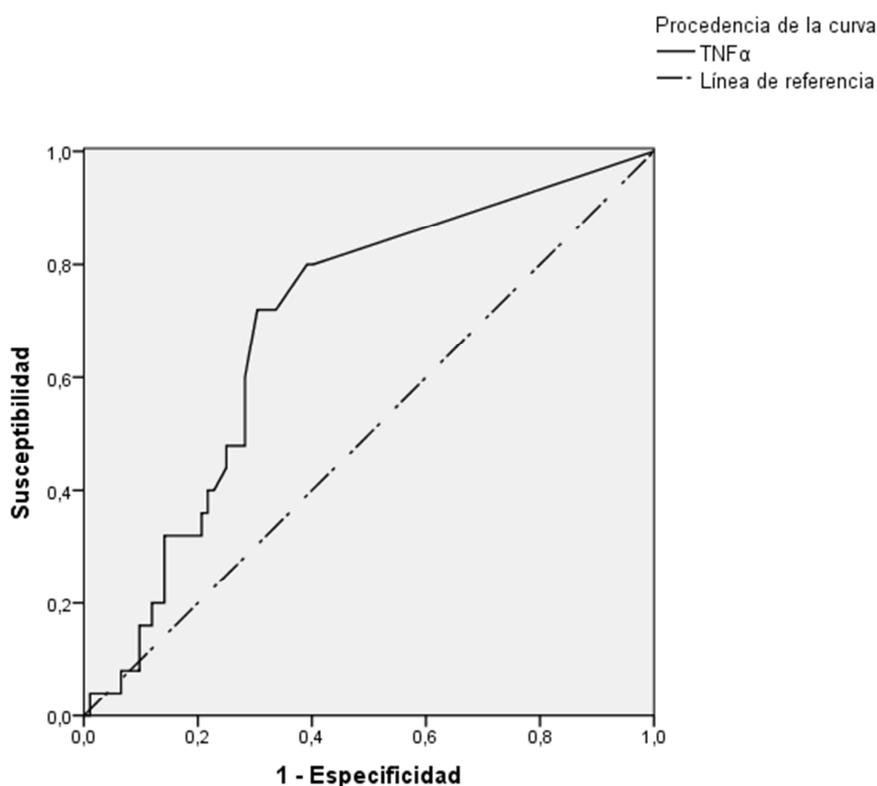


Figura 12: Curva ROC de TNF α en la predicción de PA grave o moderadamente grave

Punto de corte	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
>0.49 pg/mL)	0.69	72	70	<0.005

Tabla 16. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de TNF α en la predicción de PA grave o moderadamente grave

Curva ROC de IL4

En este caso, al tratarse IL4 de una citoquina antiinflamatoria, se comprobó si podía usarse para la predicción de una condición leve. Para ello se calculó su curva ROC *inversa*, es decir, aunque al igual que en los casos anteriores se comparan niveles de citoquina en pacientes con PA leve, frente a pacientes con PA grave o moderadamente grave, ahora lo que se calcula es la capacidad de predecir el estado “leve”. Los resultados del análisis de su curva ROC, que se muestra en la figura 13, muestran que efectivamente, los niveles altos de IL4 son predictores de una condición clínica favorable. Valores de IL4 superiores a 0.49 pg/mL predicen PA leve con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 72% (tabla 17).

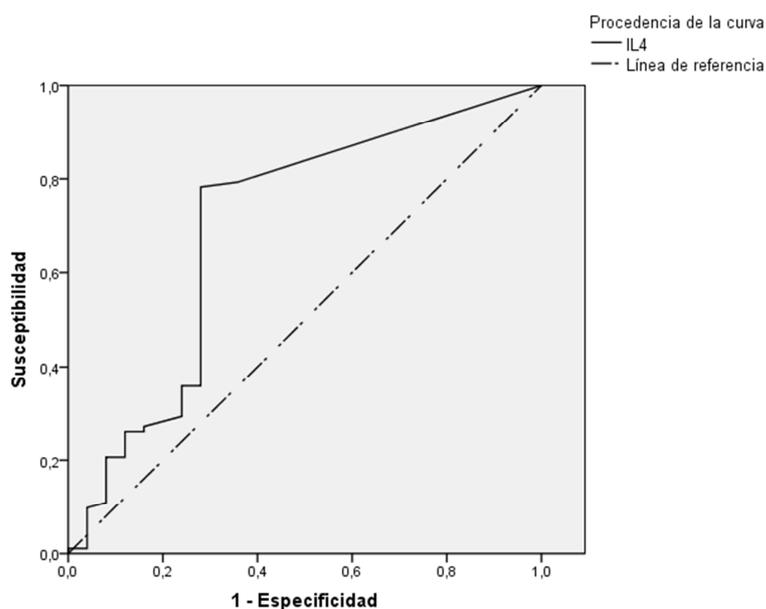


Figura 13: Curva ROC de IL4 en la predicción de PA leve

Punto de corte	AUC		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
≥ 4.50 pg/mL)	0.70	78	72	<0.005	

Tabla 17. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de IL4 en la predicción de PA leve

Curva ROC de IL13

Al igual que en el caso anterior, se comprobó si la IL13 podía usarse para la predicción de una condición leve, Para ello se calculó su curva ROC *inversa*, comparando los niveles de citoquinas en pacientes con PA leve, frente a los niveles de aquellos con PA grave o moderadamente grave, con el objetivo de determinar cuál es la capacidad de esta citoquina para predecir el estado “leve” Del análisis de su curva ROC que se muestra en la figura 14, se deduce que niveles de IL13 superiores o iguales a 3.42 pg/mL, predicen PA leve con una sensibilidad del 79% y una especificidad del 80% (tabla 18)

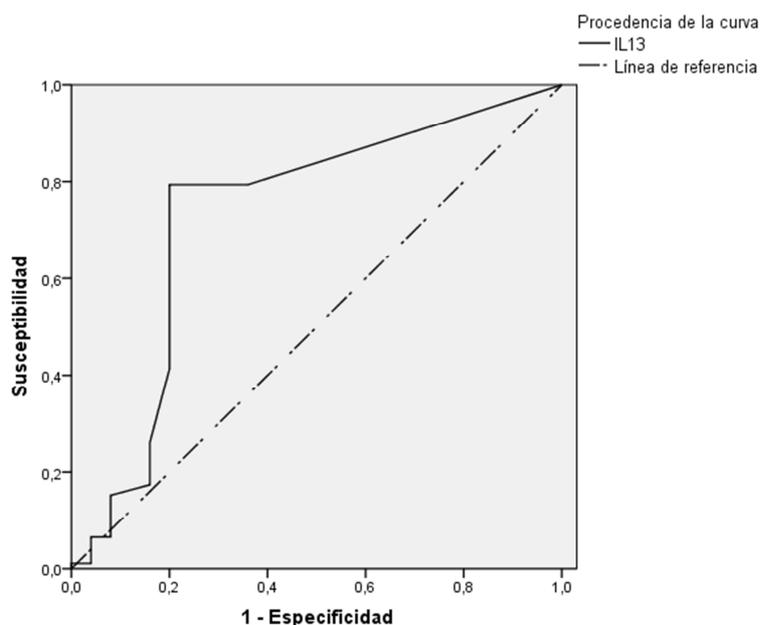


Figura 14: Curva ROC de IL13 en la predicción de PA leve

Punto de corte	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
≥3.42 pg/mL)	0.73	79	80	<0.005

Tabla 18. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de IL13 en la predicción de PA leve

Curva ROC de GM-CSF

GM-CSF es una citoquina antiinflamatoria, por lo que se comprobó si podía emplearse para la predicción de una condición leve, Para ello se calculó su curva ROC *inversa*, comparando los niveles de citoquinas en pacientes con PA leve, frente a los niveles de aquellos con PA grave o moderadamente grave, con el objetivo de determinar cuál es la capacidad de GM-CSF para predecir el estado “leve”. Los resultados del análisis de su curva ROC, que se muestra en la figura 15, muestran que efectivamente, los niveles altos de GM-CSF son predictores de una condición clínica favorable. Valores de GM-CSF superiores o iguales a 8.58 pg/mL predicen PA leve con una sensibilidad del 62% y una especificidad del 88% (tabla 19).

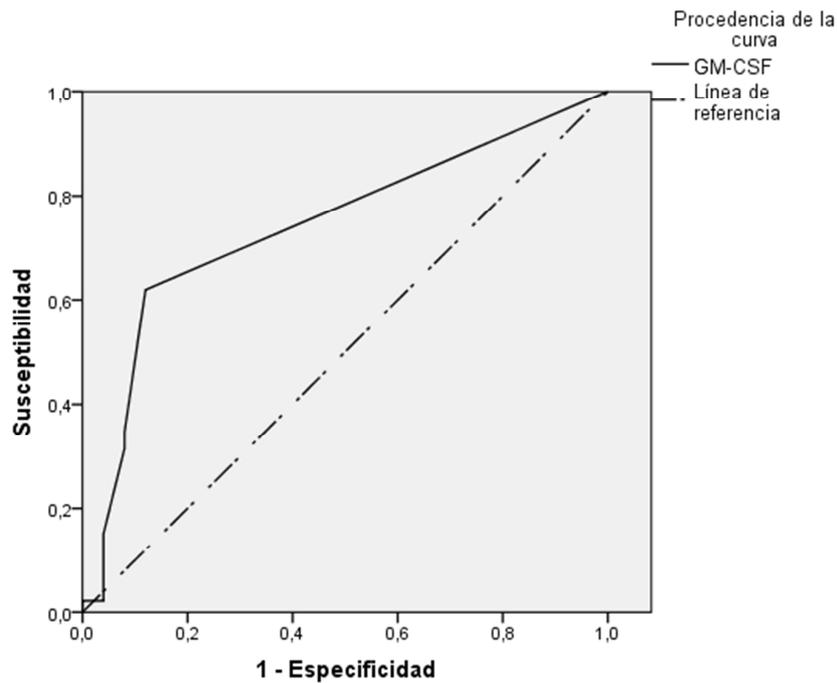


Figura 15: Curva ROC de GM-CSF en la predicción de PA leve

Punto de corte	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
≥8.58 pg/mL)	0.74	62	88	<0.005

Tabla 19. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de GM-CSF en la predicción de PA leve

Ratio IL13/IFN- γ

Con el objetivo de desarrollar una herramienta útil para la predicción de la gravedad de la pancreatitis aguda, basada en el análisis de citoquinas, se analizó que citoquinas tenían una mayor influencia en el desarrollo, o no, de PA grave.

Para ello se aplicó un modelo de regresión lineal múltiple, concretamente de regresión paso a paso. El modelo arrojó como resultado que una citoquina proinflamatoria y otra antiinflamatoria, IFN- γ e IL13, eran las que tenían un mayor peso en la discriminación entre PA leve y PA grave o moderadamente grave (Wilks' lambda = 0.747, $P < 0.0001$; Wilks' lambda = 0.855, $P < 0.0001$, respectivamente).

Por ello se calculó la ratio IL13/IFN γ y se puso a prueba la capacidad de dicho índice de actuar con valor pronóstico.

Relación entre Ratio IL13/IFN- γ y gravedad de la PA

Al comparar los pacientes con PA leve, frente a aquellos con PA grave o moderadamente grave, con el estadístico U de Mann-Whitney, se demostró que la ratio IL13/IFN γ era significativamente mayor en el grupo de pacientes con PA leve ($P = 7.36 \times 10^{-8}$).

Cuando la comparación se realizó entre los pacientes con PA grave y los pacientes con PA leve o moderadamente grave, se encontró de nuevo una diferencia significativa entre ambos grupos ($P = 7.36 \times 10^{-8}$).

Relación entre Ratio IL13/IFN- γ y exitus

Se comparó, mediante el estadístico U de Mann-Whitney, la ratio IL13/IFN- γ en pacientes fallecidos y supervivientes. Se demostró que la ratio IL13/IFN γ era significativamente mayor en el grupo de pacientes supervivientes ($P < 0.05$).

Relación entre Ratio IL13/IFN- γ y días de ingreso hospitalario o estancia en UCI

Se empleó el coeficiente de correlación de Kendall para determinar si existía una correlación entre los niveles de citoquinas y la duración del ingreso hospitalario o de la estancia en UCI. Se constata que la ratio IL13/IFN- γ se relaciona de forma lineal inversa con los días de ingreso hospitalario ($P < 0.005$) y los días de estancia en UCI ($P < 0.05$) (tabla 20).

	Coeficiente de correlación tau B de Kendall (τ)	
	Duración de ingreso hospitalario	Duración de Ingreso en UCI
Ratio IL13/IFN- γ	- 0.254*	- 0.192*

*Correlación inversa significativa.

Tabla 20. Coeficiente de correlación de Kendall. Correlación entre ratio IL13/IFN- γ y la duración del ingreso hospitalario o estancia en UCI.

Curva ROC de Ratio IL13/IFN

A continuación, se calculó su curva ROC, comparando los niveles de citoquinas en pacientes con PA leve, frente a los niveles de aquellos con PA grave o moderadamente

grave, con el objetivo de determinar cuál es la capacidad del índice para predecir el estado “leve”. Del análisis de la curva ROC, que se muestra en la figura 16, se deduce que una ratio IL13/IFN γ elevada está asociada con un pronóstico clínico favorable, con una mayor AUC (0.85) sensibilidad y especificidad que si se solo se usa como predictor los niveles en suero de IL13.

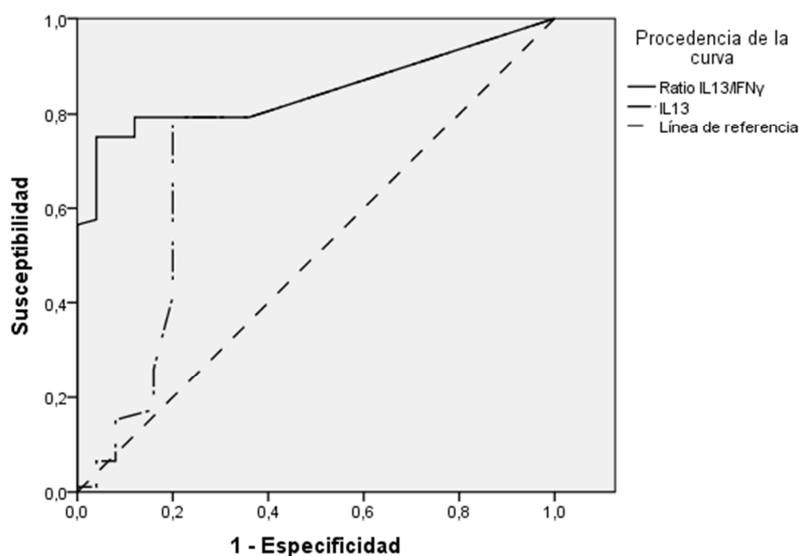


Figura 17: Curva ROC de IL13/IFN γ en la predicción de PA leve

Punto de corte	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	P
≥ 1.08	0.85	75	96	<0.0001

Tabla 21. Punto de corte, área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad de IL13/IFN γ en la predicción de PA leve

ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN GENES IMPLICADOS EN LA INFLAMACION

Uno de los principales objetivos de este trabajo es el estudio de variaciones en genes relacionados con la inflamación en pancreatitis aguda.

Los polimorfismos incluidos en el presente estudio son *IL23R rs11209026*, *TNF rs1800629*, *RIPK2 rs42490*, *NOD2 rs9302752*, *MCP1 rs1024611* y *NFKB1 rs28362491*. Se analizó como afectan a la susceptibilidad a la enfermedad, además de cuál es su influencia en la gravedad de la enfermedad y en el patrón de expresión de citoquinas.

Además, en otro estudio previo [315], estos pacientes fueron genotipados también para polimorfismos genéticos de los genes de TLR (*TLR1 rs5743611*, *TLR2 rs5743704*, *TLR3 rs3775291*, *TLR3 rs5743305*, *TLR4 rs4986790*, *TLR4 rs4986791*, *TLR5 rs5744174*, *TLR6 rs5743795*, *TLR7 rs2302267*, *TLR9 rs352140*, y *TLR10 rs4129009*). En nuestro estudio hemos analizado en este estudio la posible influencia de estas variantes genéticas sobre los patrones de producción de citoquinas detectada en los pacientes de PA.

Análisis de susceptibilidad a padecer la enfermedad

Se analizaron cinco SNPs (*IL23R rs11209026*, *TNF rs1800629*, *RIPK2 rs42490*, *NOD2 rs9302752* y *MCP1 rs1024611*), además de una mutación de inserción/delección en el promotor de *NFKB1* (*NFKB1 rs28362491*).

En primer lugar, se comprobó la existencia de Equilibrio de Hardy Weinberg para los genes estudiados, tanto en la población control en la población control como en los pacientes. Se considero que la población estaba en equilibrio cuando el p-valor era superior a 0,05.

Gen	SNP	P (<i>Pacientes</i>)	P (<i>Controles</i>)
<i>IL23R</i>	<i>rs11209026</i>	0.1912	0.8495
<i>NFKB1</i>	<i>rs28362491</i>	1	0.247
<i>TNF</i>	<i>rs1800629</i>	0.2829	0.7265
<i>RIPK2</i>	<i>rs42490</i>	0.6182	0.2917
<i>NOD2</i>	<i>rs9302752</i>	1	0.1857
<i>RANTES</i>	<i>rs2107538</i>	1	0.7087
<i>MCP1</i>	<i>rs1024611</i>	0.3074	0.6343

Tabla 22. Estudio del Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se considero que la población estaba en EHW cuando el p-valor>0,05

A continuación, se detallan, los hallazgos en nuestra población.

Las frecuencias genotípicas de los genes estudiados se compararon con poblaciones control. Solo se encontraron diferencias en el caso de *IL23R rs11209026*. Tal y como se puede comprobar en la tabla 22, en el caso de dicho SNP al comparar la distribución de genotipos en pacientes y controles encontramos diferencias significativas ($P = 6.024 \times 10^{-3}$).

A continuación, se analizaron las frecuencias alélicas. De nuevo, tan solo se apreciaron diferencias significativas en el caso de la variante *IL23R rs11209026*. Podemos observar las distribuciones alélicas de estos genes en la tabla 23. En detalle, el alelo *IL23R rs11209026-A* se encuentra asociado a un mayor riesgo de padecer pancreatitis aguda (OR=1.532, 95% CI 1.124 – 2,087, $P = 6.544 \times 10^{-3}$).

Por lo tanto, en los pacientes analizados, ser portador del alelo A de *IL23R rs11209026* confiere un mayor riesgo de padecer PA.

RESULTADOS

Gen	rs	Genotipo	Pacientes		Controles		P
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
IL23R	rs11209026	AA	5 (1.9)	7 (0.5)	0.006433		
		AG	46 (17.6)	207 (13.6)			
		GG	211 (80.5)	1303 (85.9)			
TNF	rs1800629	AA	7 (2.6)	22 (1.5)	NS		
		AG	57 (21.5)	337 (22.2)			
		GG	201 (75.8)	1158 (76.3)			
RIPK2	rs42490	GG	54 (20.5)	280 (18.6)	NS		
		GA	126 (47.7)	717 (47.4)			
		AA	84 (31.8)	515 (34.0)			
NOD2	rs9302752	TT	21 (7.9)	112 (7.4)	NS		
		TC	107 (40.2)	639 (41.1)			
		CC	138 (51.9)	766 (50.5)			
MCP1	rs1024611	GG	18 (6.9)	93 (6.1)	NS		
		GA	89 (34.0)	581 (38.3)			
		AA	155 (59.2)	842 (55.5)			
NFKB1	rs28362491	del/del	30 (11.2)	28 (9.0)	NS		
		del/ins	121 (45.0)	146 (46.8)			
		ins/ins	118 (43.9)	138 (44.2)			
RANTES	rs2107538	TT	11 (4.0)	11 (2.8)	NS		
		TC	87 (32.3)	103 (26.7)			
		CC	171 (63.6)	272 (70.5)			

rs = Reference SNP number; del = deleción -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 22: Frecuencias genotípicas en pacientes y controles

Gen	rs	Alelo	Pacientes 2n (%)	Controles 2n (%)	P	OR
IL23R	rs11209026	A	56 (10.7)	220 (7.3)	6.544 x 10 ⁻³	1.523
		G	466 (89.27)	2804 (92.7)		
TNF	rs1800629	A	71 (13.4)	381 (12.6)	NS	
		G	459 (86.6)	2653 (87.4)		
RIPK2	rs42490	G	234 (44.3)	1277 (42.2)	NS	
		A	294 (55.7)	1747 (57.8)		
NOD2	rs9302752	T	149 (28.0)	863 (28.4)	NS	
		C	383 (72.0)	2171 (71.6)		
MCP1	rs1024611	G	125 (23.9)	767 (25.3)	NS	
		A	399 (76.1)	2265 (74.7)		
NFKB1	rs28362491	del	181 (33.6)	202 (32.4)	NS	
		ins	357 (66.4)	422 (67.6)		
RANTES	rs2107538	T	109 (20.3)	125 (16.2)	NS	
		C	429 (79.7)	647 (83.8)		

rs = Reference SNP number; del = deleción -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 23: Frecuencias genótípicas en pacientes y controles

Análisis de la influencia de las variables genéticas en la gravedad de la PA

Con el objetivo de estudiar la influencia de los polimorfismos estudiados en la gravedad de la pancreatitis se procedió a la estratificación de los pacientes en base a la clasificación de Atlanta 2012 y a la mortalidad.

De este modo, se establecieron tres grupos: pacientes con PA grave, pacientes con PA grave o moderadamente grave, y pacientes fallecidos. Las frecuencias genótípicas y alélicas de cada uno de los tres grupos se contrastaron con las de los controles.

Asociación de polimorfismos estudiados con PA grave

Tras la estratificación de los pacientes en base al desarrollo de PA grave, quedamos con doce pacientes. A pesar de la dificultad que entraña extraer información del análisis de un número tan reducido de individuos, se apreciaron ciertas diferencias entre éstos y los controles. A continuación, se detallan, los hallazgos más relevantes.

No se encontraron diferencias significativas cuando las frecuencias genotípicas de los genes estudiados se compararon con la de los controles, tal y como puede consultarse en la tabla 24. Sin embargo, cabe destacar que en caso de *RIPK2 rs42490*, las frecuencias de los genotipos GG y GA se encuentran sobrerrepresentadas respecto a los controles ($P = 0.062$).

A continuación, se analizaron las frecuencias alélicas, que pueden ser consultadas en la tabla 25. Únicamente se hallaron diferencias significativas en el caso de la variante *RIPK2 rs42490*. El alelo G de dicha variante se encuentra asociado a un mayor riesgo de PA grave (OR=2.736; 95% CI, 1.167-6.413; $P = 1.583 \times 10^{-2}$).

Así pues, ser portador del alelo G *RIPK2 rs42490* confiere un mayor riesgo de padecer PA grave.

Asociación de polimorfismos estudiados con PA grave o moderadamente grave

Los pacientes fueron estratificados en base a la clasificación de Atlanta 2012. Hay 12 pacientes con PA grave, y 26 con PA moderadamente grave, que suman un total de 38 pacientes. Los hallazgos, que se detallan a continuación, son muy similares a los del apartado anterior.

Gen	rs	Genotipo	Pacientes	Controles	P
			n (%)	n (%)	
IL23R	rs11209026	AA	0 (0)	7 (0.5)	NS
		AG	1 (8.3)	207 (13.6)	
		GG	11 (91.6)	1303 (85.9)	
TNF	rs1800629	AA	0 (0)	22 (1.5)	NS
		AG	1 (8.3)	337 (22.2)	
		GG	11 (91.6)	1158 (76.3)	
RIPK2	rs42490	GG	5(41.6)	280 (18.6)	NS
		GA	6 (47.7)	717 (47.4)	
		AA	1 (8.3)	515 (34.0)	
NOD2	rs9302752	TT	1 (8.3)	112 (7.4)	NS
		TC	4 (33.3)	639 (41.1)	
		CC	7 (58.3)	766 (50.5)	
MCP1	rs1024611	GG	1 (8.3)	93 (6.1)	NS
		GA	5(41.6)	581 (38.3)	
		AA	6 (47.7)	842 (55.5)	
NFKB1	rs28362491	del/del	1 (8.3)	28 (9.0)	NS
		del/ins	9 (16.7)	146 (46.8)	
		ins/ins	2 (43.9)	138 (44.2)	
RANTES	rs2107538	TT	1 (8.3)	11 (2.8)	NS
		TC	5(41.6)	103 (26.7)	
		CC	6 (4.7)	272 (70.5)	

rs = Reference SNP number; del = deleción -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 24: Frecuencias genotípicas en pacientes con PA grave, y en controles sanos

RESULTADOS

		Pacientes		Controles			
	rs	Alelo	2n (%)	2n (%)	P	OR	
<i>IL23R</i>	<i>rs11209026</i>	A	1 (4.2)	221 (7.3)	NS		
		G	23 (95.8)	2813 (92.7)			
<i>TNF</i>	<i>rs1800629</i>	A	1 (4.2)	381 (12.6)	NS		
		G	23 (95.8)	2653 (87.4)			
<i>RIPK2</i>	<i>rs42490</i>	G	16 (66.7)	1277 (42.2)	1.583x10 ⁻²	2.736	
		A	8 (33.3)	1747 (57.8)			
<i>NOD2</i>	<i>rs9302752</i>	T	6 (25.0)	863 (28.4)	NS		
		C	18 (75)	2171 (71.6)			
<i>MCP1</i>	<i>rs1024611</i>	G	7 (29.2)	767 (25.3)	NS		
		A	17 (70.8)	2265 (74.7)			
<i>NFKB1</i>	<i>rs28362491</i>	del	11 (45.8)	202 (32.4)	NS		
		ins	13 (54.2)	422 (67.6)			
<i>RANTES</i>	<i>rs2107538</i>	T	7 (29.2)	102 (19.8)	NS		
		C	17 (70.8)	412 (80.2)			

rs = Reference SNP number; del = deleción -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 25: Frecuencias alélicas en pacientes con PA grave, y en controles sanos

Cuando se analizaron las frecuencias genotípicas de estos pacientes no se encontraron diferencias significativas con las de los controles, tal y como puede consultarse en la tabla 26. Sin embargo, de nuevo se observa que en caso de *RIPK2* rs42490, las frecuencias de los genotipos GG y GA se encuentran sobrerrepresentadas respecto a los controles ($P = 0.074$).

A continuación, se analizaron las frecuencias alélicas, que pueden ser consultadas en la tabla 27. Solamente se encontraron diferencias significativas en el caso del polimorfismo *RIPK2* rs42490, cuyo alelo G se encuentra asociado a un mayor riesgo de PA grave o moderadamente grave (OR 1.609; 95% CI, 1.013-2.557; $P = 4.206 \times 10^{-2}$).

Gen	rs	Genotipo	Pacientes	Controles	P
			n (%)	n (%)	
IL23R	rs11209026	AA	0 (0)	7 (0.5)	NS
		AG	5 (13.2)	207 (13.6)	
		GG	33 (86.8)	1303 (85.9)	
TNF	rs1800629	AA	1 (2.6)	22 (1.5)	NS
		AG	10 (26.3)	337 (22.2)	
		GG	27 (71.1)	1158 (76.3)	
RIPK2	rs42490	GG	9(24.3)	280 (18.6)	NS
		GA	22 (59.5)	717 (47.4)	
		AA	6 (16.2)	515 (34.0)	
NOD2	rs9302752	TT	1 (2.6)	112 (7.4)	NS
		TC	14 (36.8)	639 (41.1)	
		CC	23 (60.5)	766 (50.5)	
MCP1	rs1024611	GG	2 (5.4)	93 (6.1)	NS
		GA	13(35.1)	581 (38.3)	
		AA	22 (59.5)	842 (55.5)	
NFKB1	rs28362491	del/del	4 (10.5)	28 (9.0)	NS
		del/ins	22 (57.9)	146 (46.8)	
		ins/ins	12 (43.9)	138 (44.2)	
RANTES	rs2107538	TT	2 (8.3)	11 (2.8)	NS
		TC	11(41.6)	103 (26.7)	
		CC	25 (4.7)	272 (70.5)	

rs = Reference SNP number; del = deleción -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 26: Frecuencias genotípicas en pacientes con PA grave o moderadamente grave, y en controles sanos

RESULTADOS

Gen	rs	Alelo	Pacientes	Controles	P	OR
			2n (%)	2n (%)		
IL23R	rs11209026	A	5 (6.6)	221 (7.3)	NS	
		G	71 (93.4)	2813 (92.7)		
TNF	rs1800629	A	12 (15.8)	381 (12.6)	NS	
		G	64 (84.2)	2653 (87.4)		
RIPK2	rs42490	G	40 (54.1)	1277 (42.2)	4.206 x 10 ⁻²	1.609
		A	34 (45.9)	1747 (57.8)		
NOD2	rs9302752	T	16 (21.1)	863 (28.4)	NS	
		C	60 (78.9)	2171 (71.6)		
MCP1	rs1024611	G	17 (23.0)	767 (25.3)	NS	
		A	57 (77.0)	2265 (74.7)		
NFKB1	rs28362491	del	30 (39.5)	202 (32.4)	NS	
		ins	46 (60.5)	422 (67.6)		
RANTES	rs2107538	T	15 (22.37)	102 (19.8)	NS	
		C	61 (77.6)	412 (80.2)		

rs = Reference SNP number; del = delección -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 27: Frecuencias alélicas en pacientes con PA grave o moderadamente grave, y en controles sanos

Análisis de la influencia de las variables genéticas en la mortalidad de la PA

Se llevó a cabo la estratificación de los pacientes dependiendo de la mortalidad para determinar si existía alguna asociación con los polimorfismos analizados, tras lo cual quedaron ocho individuos. A pesar de este reducido número, se apreció al analizar las frecuencias alélicas una asociación entre *RIPK2* rs42490 y la mortalidad (tabla 28). El alelo G de dicha variante se encuentra asociado a un mayor riesgo de fallecer (OR 3.010; 95% CI, 1.043-8.684; $P = 3.226 \times 10^{-2}$).

Grupo muestral		AA	Aa	aa	Interacción Epistática	
Gen	rs	Alelo	Pacientes	Controles	P	OR
			2n (%)	2n (%)		
<i>IL23R</i>	<i>rs11209026</i>	A	1 (6.3)	221 (7.3)	NS	
		G	15 (93.7)	2813 (92.7)		
<i>TNF</i>	<i>rs1800629</i>	A	2 (12.5)	381 (12.6)	NS	
		G	14 (87.5)	2653 (87.4)		
<i>RIPK2</i>	<i>rs42490</i>	G	11 (68.7)	1277 (42.2)	3.226x10 ⁻²	3.010
		A	5 (31.3)	1747 (57.8)		
<i>NOD2</i>	<i>rs9302752</i>	T	3 (18.8)	863 (28.4)	NS	
		C	13 (81.2)	2171 (71.6)		
<i>MCP1</i>	<i>rs1024611</i>	G	5 (31.3)	767 (25.3)	NS	
		A	11 (68.7)	2265 (74.7)		
<i>NFKB1</i>	<i>rs28362491</i>	del	8 (50.0)	202 (32.4)	NS	
		ins	8 (50.0)	422 (67.6)		
<i>RANTES</i>	<i>rs2107538</i>	T	5 (31.3)	102 (19.8)	NS	
		C	11 (68.7)	412 (80.2)		

rs = Reference SNP number; del = delección -94ATTG; ins = inserción -94ATTG

Tabla 28: Frecuencias alélicas en pacientes fallecidos, y en controles sanos

Influencia de interacciones epistáticas en la susceptibilidad a la PA

Se consideró la posible existencia de interacciones entre diferentes genes y su influencia en la susceptibilidad a la PA. Para ello se analizaron las interacciones epistáticas entre *L23R rs11209026*, *TNF rs1800629*, *RIPK2 rs42490*, *NOD2 rs9302752*, y *MCP1 rs1024611*. *NFKB1 rs28362491* y *RANTES rs2107538* no pueden ser analizados debido a que para estos dos polimorfismos los controles utilizados son otros diferentes, tal y como se detalla en material y métodos

RESULTADOS

				OR_{interaccion}	P
Controles	23:333:1160	5:57:190	1:3:8		
Pacientes de PA	2:37:170	4:18:23	1:1:3	4.031	1.205 x 10 ⁻⁵

Tabla 29. Interacción epistática entre *IL23R rs11209026* y *TNF rs11209026*. Los alelos mayoritarios y minoritarios de *IL23R rs11209026* se denotan con las letras A y a, respectivamente, y los de *TNF rs1800629* con las letras B y b, respectivamente.

Se examinó la interacción entre cada par de polimorfismos, siendo incluidos en el análisis los pacientes tipados para cada par, y excluyendo a aquellos sin datos para uno de los SNP.

Este análisis reveló la existencia de una interacción epistática entre *IL23R rs11209026* y *TNF rs1800629* que afecta significativamente al riesgo de padecer pancreatitis aguda ($P= 1.205 \times 10^{-5}$; $OR_{interacción}= 4.031$). En la tabla 29 se muestran las tablas de 3x3 de *IL23R rs11209026* y *TNF rs1800629* 3x3 tanto para casos como para controles.

Asociación de polimorfismos con etiología de la pancreatitis

Entre los muchos factores que han sido reconocidos como causantes de PA, destaca en particular la migración de cálculos biliares. Sin embargo, muchas personas albergan durante toda su vida cálculos biliares sin mostrar ningún síntoma, y solo unos pocos desarrollan PA. Por esta razón, decidimos estudiar los polimorfismos genéticos en los 177 pacientes con PA litiásica. No se hallaron diferencias entre las frecuencias fenotípicas y alélicas de dichos pacientes y las de los controles. Tampoco se encontraron diferencias al comparar estos pacientes con los pacientes con otras etiologías.

A continuación, se estudió la asociación de polimorfismos con la PA idiopática. En nuestra cohorte de pacientes hay sólo 40 pacientes con PA idiopática. No se encuentran diferencias significativas al comparar estos pacientes con aquellos con otras etiologías conocidas, sin embargo, al compararlos con los controles sí que se detecta una asociación del alelo T de *NOD2* rs9302752 con la PA idiopática (OR 1.694; $P = 1.984 \times 10^{-2}$).

Análisis de la influencia de las variables genéticas en los niveles de citoquinas en suero

Tras la estratificación de los pacientes en base al genotipo de los SNPs estudiados se encontraron ciertas diferencias con respecto a los niveles de citoquinas. A continuación, se detallan los hallazgos encontrados, que también pueden consultarse en la tabla 30.

Hay un aumento en los niveles séricos de IFN γ en los pacientes del alelo *RIPK2* rs42490 -G. Los portadores de mutación en el SNP *TNF* rs1800629 tienen niveles elevados de IL9, además de menos GM-CSF en suero, mientras que los pacientes portadores del alelo *MCP1* rs1024611 -G tienen niveles séricos de IL1b y GM-CSF disminuidos. Los niveles de GM-CSF están también disminuidos en los individuos portadores del alelo *RANTES* rs2107538 -T

También se analizó la influencia de polimorfismos en genes de TLRs en los niveles de citoquinas. Se analizaron los siguientes TLR: *TLR1* rs5743611, *TLR2* rs5743704, *TLR3* rs3775291, *TLR3* rs5743305, *TLR4* rs4986790, *TLR4* rs4986791, *TLR5* rs5744174, *TLR6* rs5743795, *TLR7* rs2302267, *TLR9* rs352140, y *TLR10* rs4129009.

La población estudiada se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg para todos ellos.

Se encontraron varias asociaciones entre variantes en genes de TLRs, con respecto a los niveles de citoquinas. Pacientes portadores del alelo *TLR1 rs5743611-C* muestran un aumento de los niveles de IL12p70. Los niveles de IL1b e IL4 son más bajos en pacientes portadores de mutación en el SNP *TLR6 rs5743795*. Los niveles de IFN γ son mayores en presencia de mutación en *TLR9 rs352140*, mientras que los de GM-CSF son menores.

Aumento de secreción				
Gen	rs	Alelo	Citoquina	P
<i>RIPK2</i>	<i>rs42490</i>	G	IFN γ	<0.05
<i>TNF</i>	<i>rs1800629</i>	A	IL9	<0.05
<i>TLR1</i>	<i>rs5743611</i>	C	IL2p70	<0.05
<i>TLR9</i>	<i>rs352140</i>	C	IFN γ	<0.05
Descenso de secreción				
Gen	rs	Alelo	Citoquina	P
<i>MCP1</i>	<i>rs1024611</i>	G	IL1 β	<0.05
<i>TNF</i>	<i>rs1800629</i>	A	GMCSF	<0.05
<i>RANTES</i>	<i>rs2107538</i>	T	GMCSF	<0.05
<i>MCP1</i>	<i>rs1024611</i>	G	GMCSF	<0.05
<i>TLR6</i>	<i>rs5743795</i>	A	IL1 β	<0.05
<i>TLR6</i>	<i>rs5743795</i>	A	IL1 β	<0.05

Tabla 30. Relación entre variantes genéticas y los niveles de citoquinas. Solo se muestran en la tabla las asociaciones significativas.

DISCUSSION

DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE

El grupo de estudio, tal como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, está constituido por 269 individuos. El porcentaje de hombres y mujeres es de 47,92 y 52,8% respectivamente. La distribución por sexos es por lo tanto muy próxima al 50%, en consonancia con lo publicado en otras series de pacientes españoles [316, 317]. La edad media es de 64.58 +/- 18.2 años, sin que existan diferencias significativas entre hombres (63.31 +/- 18.44) y mujeres (65.7 +/- 17.95).

En cuanto a la etiología, 177 de los casos (65,6% del total) tuvieron un origen litiásico, 28 de los casos un origen etílico (10,4% del total), mientras que 8 de los casos fueron posteriores a la realización de CPRE, lo que supone el 3% de los casos. En 7 casos (5,6 %) la PA tuvo otro origen diferente a los detallados anteriormente. Estos datos están en consonancia con lo descrito en la literatura, las causas más comunes que se han descrito para la PA son los cálculos biliares y el consumo de alcohol, que en conjunto suman el 60% 80% de los casos [318]. De ellos, la presencia de cálculos biliares (incluyendo la microlitiasis) es la causa más común, representando del 40 al 70 por ciento de los casos [319]. La incidencia de etiología biliar y alcohólica difiere considerablemente entre diferentes regiones geográficas. En Finlandia la PA de origen alcohólico representa en 79,3% de los casos, frente al 6,3 % de etiología litiásica [320]. Por el contrario, en los países del sur de Europa, la principal causa de PA son los cálculos biliares, sumando el 71,4% de los casos en Grecia, y el 60,3% en Italia [321]. En la península ibérica la colelitiasis es más frecuente que el alcohol en la etiología de la PA, sumando el 60% frente al 24% en

Portugal [321]. En España, la incidencia de PA de origen litiásico se encuentra entre el 50 y el 65% [316, 317, 322-324].

Los pacientes fueron clasificados según el criterio de Atlanta 2012. Doce casos, un 4.5% cursaron con un episodio de PA grave. 12 casos, un 4,5%, el episodio de Pancreatitis aguda fue clasificado como "Grave"; en 26 casos, que agrupan al 9,7% de los pacientes, el episodio fue clasificado como "Moderadamente Grave"; por último, 231 de los pacientes, que agrupan al 85,9% del total, sufrieron un episodio que puede clasificarse como "Leve". Al consultar en la literatura científica los datos referidos a otras series de pacientes se constata que hay diferencias notorias entre diferentes cohortes. Por ejemplo, un estudio realizado en Reino Unido en 228 pacientes cifra en 129 (56.6%), 65 (28.5%) y 34 (14.9%) los pacientes con PA leve, moderadamente grave, o grave, respectivamente [325]; mientras que otro realizado en un hospital lituano en 103 pacientes cifra estos porcentajes en 47.6% para la PA leve, 26.2% para la moderadamente grave, y 26.2% para la PA grave [326]. Nuestros porcentajes son más similares a los de un estudio realizado recientemente en Alicante. De 543 episodios, un 67% fue leve, un 30% moderadamente grave, y un 4% grave [327].

En cuanto a otros marcadores de gravedad, la duración media del ingreso hospitalario fue de 9,60 días (rango 2-90 días). El 4,1% de los pacientes necesitó ser ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), que tuvo una duración media de 13,64 días (rango 1-37 días). 8 de los pacientes fallecieron, lo que representa una mortalidad del 3%.

Generalmente, la mortalidad en la pancreatitis aguda durante las dos primeras semanas se debe a al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y al fallo orgánico, mientras que tras dos semanas se debe principalmente a sepsis y sus complicaciones [328, 329]. La mortalidad global de la pancreatitis aguda se sitúa aproximadamente en un 5% [15]. La mortalidad en nuestra cohorte es inferior, del 3%, similar a lo publicado en otras cohortes españolas [327].

Con todo ello, podemos concluir que la muestra de pacientes con pancreatitis aguda estudiada en este trabajo, es una muestra representativa de la población total de pacientes con PA.

CITOQUINAS EN LA PANCREATITIS AGUDA

En este trabajo hemos valorado la posible influencia de varias citoquinas (IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13 e IL18) en la pancreatitis aguda.

En el estudio de citoquinas se incluyó a 117 pacientes. Tal y como se detalla en la sección de resultados, las características de este subgrupo no se apartan substancialmente de aquellas de la totalidad de los pacientes, por lo tanto, puede concluirse que se trata de una muestra representativa del total de los pacientes incluidos en el trabajo.

Comparación de los niveles de citoquinas entre controles sanos y pacientes con pancreatitis aguda (PA)

Se seleccionó un grupo control de 20 pacientes sin patologías digestivas, seleccionada de manera que fuera lo más parecida posible en cuanto a sexo y edad a los 117 pacientes incluidos en el estudio de citoquinas.

No se observó ninguna correlación entre las concentraciones séricas de citoquinas y la etiología de la PA, que parece tener poco o ningún impacto sobre la tasa de mortalidad, tal y como se informó con anterioridad [27, 321, 330].

Los resultados obtenidos, confirman la alteración de los niveles de citoquinas séricas en pancreatitis aguda, observándose en los pacientes de PA concentraciones significativamente más altas de varias IFN- γ , TNF- α , IL1- β , IL4, IL6, IL10, IL13 e IL18 que en los controles sanos.

Un hallazgo importante fue la constatación de que coexisten en estos pacientes dos perfiles de citoquinas diferenciados, y que dicho perfil tiene un impacto en el pronóstico de la enfermedad.

Se identificaron dos perfiles distintos: un perfil con predominio de citoquinas proinflamatorias y otro distinto en el que predominan las citoquinas TH2

En los pacientes con pancreatitis aguda grave se observaron concentraciones séricas significativamente más elevadas de IFN- γ , TNF α , IL5, IL6 e IL10, que en los pacientes con PA moderadamente grave o leve. Las concentraciones de IFN γ , TNF α

e IL6 también se encuentran más elevadas en pacientes con pancreatitis aguda grave o moderadamente grave que en aquellos con PA leve.

Además, se encontró una correlación lineal positiva entre las concentraciones de IFN γ , TNF α , IL6, IL10, IL18 y la duración de la estancia hospitalaria y entre las concentraciones de IFN γ , TNF α , IL6 e IL10 y la duración de la estancia en la UCI.

Finalmente, las concentraciones de IFN- γ , IL5, IL6, TNF α , IL18 e IL10 fueron significativamente más altas en los pacientes que fallecieron que en los supervivientes

En conjunto, estos datos acerca de IFN γ , TNF α , IL6, e IL18 confirman los efectos perjudiciales previamente descritos de las citoquinas proinflamatorias en la PA [18, 19, 225].

El interferón gamma (IFN γ) es un factor eminentemente proinflamatorio, que actúa modulando la expresión de varias citoquinas [237]. Provoca un aumento de la expresión de IL-12, que induce la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a linfocitos TH1. Además IL-12 es a su vez es un importante regulador de la producción de IFN γ , lo que amplifica el proceso inflamatorio [237]. El IFN γ también induce la represión de la producción de IL-10, para evitar la regulación negativa de la actividad inflamatoria [237].

Niveles elevados de IFN γ se asocian con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) [331-334]. Se trata de una complicación potencialmente letal [260], que desencadena una compleja cascada inflamatoria, con una liberación excesiva de mediadores proinflamatorios, entre los que se incluye a varias

citoquinas (IL1, IL6 e IL8), al factor de crecimiento transformante (TGF), y al factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros [260].

A pesar de que el papel del IFN γ en el SIRS es conocido desde hace tiempo, hay pocos trabajos que hayan estudiado su papel en la pancreatitis aguda.

En un modelo murino de pancreatitis experimental, se halló que la administración de IFN γ está asociada a una peor condición clínica [335]. Además, en ratas, se ha comprobado que el IFN γ induce un aumento de la permeabilidad intestinal, favoreciendo la traslocación de bacterias y endotoxinas procedentes de la luz intestinal [336, 337]. Durante la PA grave, la permeabilidad de la mucosa gastrointestinal aumenta durante la fase inicial [338, 339], lo que facilita la translocación de bacterias / endotoxinas. El mecanismo por el cual se produce este aumento de la permeabilidad no se comprende en su totalidad, pero podría estar mediado por la apoptosis de enterocitos inducida por IFN γ [336]. Tanto en los datos experimentales como clínicos sugieren que la translocación de bacterias o endotoxinas contribuye al fallo orgánico múltiple y a la mortalidad en PA grave [336].

En humanos se ha comprobado que durante la PA, el aumento de los niveles de IFN γ se asocia a alteración de las poblaciones linfocitarias, y linfopenia [340]. Sin embargo, cabe señalar que existen trabajos en los que no hallan relación entre niveles de IFN γ y gravedad de la enfermedad [18, 134].

Nuestro trabajo confirma un papel perjudicial del IFN γ en la PA. Encontramos que valores de IFN γ por encima de 4.47 pg/mL son predictores de PA grave o

moderadamente grave, con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 81.5%.

TNF- α es una citoquina clave en la primera línea de la inflamación [299]. Es el principal mediador de shock séptico en las infecciones bacterianas y en otros tipos de shock en variadas patologías [238]. Es una citoquina sintetizada principalmente por macrófagos. Durante la pancreatitis aguda el TNF- α se sintetiza en el páncreas por los leucocitos que invaden el parénquima pancreático [238].

Induce la expresión de otras citoquinas entre las que se encuentran IL-6 e IL-8 [240], y de moléculas de adhesión celular [241]. El TNF- α es una citoquina muy importante en el desarrollo del SIRS [260].

Paradójicamente, a pesar de su importancia, solo es posible detectar la presencia de TNF- α en el suero de una minoría de los pacientes de PA. Se estima que se observa en niveles detectables en solo del 10% al 40% de todos los pacientes con PA y en el 23% a 45% de los casos fatales [69]. Ello se debe a varias causas, entre las que se encuentran una vida media en el suero corta, de tan solo 14-18 minutos, ya que hígado y riñones la retiran rápidamente de la circulación [299]. Además, parte del TNF- α liberado en el páncreas durante la enfermedad es inactivado *in situ*, debido a que los neutrófilos activados liberan una gran cantidad de elastasas, que inactivan a TNF- α [99].

Altos niveles de TNF α al inicio de la PA han sido relacionados con el desarrollo de fallo multiorgánico [341]. Además, se ha relacionado la presencia en suero de niveles altos de receptores para TNF (sTNF-RI y sTNF-RII) con la pancreatitis aguda, y en particular, con fallo multiorgánico [342]. Otro mecanismo por el cual el

TNF puede contribuir a la gravedad de la pancreatitis, además de su papel como citoquina proinflamatoria, es a través de la inducción de apoptosis de las células acinares [225].

La mayoría de los estudios han encontrado una relación entre niveles séricos elevados de TNF- α con una mayor gravedad de la PA [99, 341, 343]. En ellos se constata la capacidad de TNF-a para diferenciar entre pancreatitis leve y grave dentro de las 24 h de inicio de los síntomas. Sin embargo, cabe destacar que hay trabajos en lo que no se encuentra relación entre niveles séricos de TNF α y gravedad de la PA [18, 134]. Una posible para estas discrepancias es la corta vida media en suero de TNF α [344]. Nuestro trabajo sirve para confirmar la utilidad de TNF- α en la predicción de la gravedad de la pancreatitis aguda en las primeras 24 horas. Nuestros datos muestran que valores de TNF α superiores a 0.49 pg/mL predicen PA grave o moderadamente grave con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 70%.

La IL-6 es una importante citoquina proinflamatoria, entre sus efectos se encuentra el inducir la liberación de proteínas de fase aguda por parte del hígado, como proteína C reactiva (PRC), y en especial, fibrinógeno [242]. En el tejido inflamado induce la apoptosis de neutrófilos y el reclutamiento de monocitos/macrófagos [227, 243, 244]. La IL-6 también afecta a la actividad de los linfocitos T; induce el reclutamiento de linfocitos T, controla la proliferación y la supervivencia de los linfocitos TH1 y TH2, es un factor clave del linaje TH17 y además puede inhibir las funciones de las células T reguladoras [245]. IL-6 estimula la quimiotaxis a través de la estimulación de la familia de receptores TLRs

tipo Toll [260]. Los niveles elevados de IL-6 están asociados con el desarrollo de SIRS [260].

Durante la PA la IL-6 en suero marca un máximo unas 24 a 36 h antes que la PCR. A continuación, los niveles séricos tienden a disminuir rápidamente en el transcurso de las primeras 48 h, a menos que se desarrolle complicaciones como necrosis infectada o un absceso pancreático [109]. Por supuesto, esto hace que la IL-6 sea un parámetro interesante no solo para la estratificación temprana del riesgo, sino también como un marcador para prevenir las complicaciones [344].

Se ha descrito una relación entre altos niveles de IL6 al inicio de la PA y desarrollo de fallo renal, respiratorio, y circulatorio [341]. Los niveles altos de IL-6 e IL-8 son predictores de lesión pulmonar aguda [345].

Los niveles de IL-6 se encuentran elevados en la pancreatitis aguda, y sirven como marcadores de la gravedad [346]. Su papel en la PA es esencialmente de diagnóstico, ya que ayuda en la predicción de la gravedad. Esto permite que los pacientes con mayor riesgo sean sometidos a una monitorización intensiva que permita identificar de forma temprana las complicaciones [299].

Nuestro estudio es coincidente con la información publicada hasta la fecha. Según nuestro trabajo la IL-6 puede emplearse para la predicción de pancreatitis aguda grave o moderadamente grave. Los datos muestran que valores de IL6 superiores a 52.30 pg/mL predicen PA grave o moderadamente grave con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 83%.

La IL-18, o factor inductor del interferón-gamma es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos y células de Kupffer que en los humanos está codificada por el gen *IL18* [248, 249].

La IL-18 induce la liberación de IFN- γ que desempeña un papel importante en la activación de macrófagos y otras células [250]. Es más, entre la IL-18 e IL-12 existe un marcado sinergismo en la inducción de la expresión de IFN- γ en linfocitos T [250]. Aunque IL-18 no induce el desarrollo de células TH1, es esencial para la inducción y activación efectivas de células TH1 por IL-12 [250, 251]. Además, puede activar a las células NK independientemente de IL-12 [251]. La producción excesiva de IL-12 por macrófagos activados puede inducir trastornos multiorgánicos que incluyen la alteración del sistema inmunitario [250].

En lo que respecta al papel de la IL-18 durante la pancreatitis aguda los estudios publicados hasta el momento muestran que los niveles séricos de la IL-18 se correlacionan con la gravedad de la PA [18, 347-349]. Se ha descrito que, en la pancreatitis aguda, niveles elevados de IL-18 se asocian con el desarrollo de fallo renal, hepático y respiratorio [341, 347].

Nuestros resultados están en línea con lo anteriormente publicado. En nuestra serie los niveles altos de IL-18 se correlacionan con una estancia hospitalaria prolongada y mayor mortalidad

Nuestro estudio también encontró que las concentraciones elevadas de IL10 e IL5 en suero estaban asociadas con una mayor gravedad de la PA.

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que modula la diferenciación de linfocitos Th a linfocitos TH2, y que a su vez forma parte de la respuesta TH2 [299]. Es sintetizada principalmente por linfocitos TH2, monocitos y linfocitos B [299]. Disminuye la liberación de las citoquinas TH1 [350], e inhibe la unión al ADN de NF- κ B después de la estimulación con lipopolisacáridos (LPS) [351].

Aunque se considera una citoquina antiinflamatoria, la IL10 puede tener efectos pleiotrópicos, y ejercer efectos antiinflamatorios y proinflamatorios. Entre los efectos proinflamatorios se encuentra la reducción de la expresión de MHC clase II, el aumento del tiempo de supervivencia de los linfocitos B y el bloqueo de las vías de señalización NF- κ B y JAK- STAT [260]. Parece ser que actúa promoviendo los mecanismos efectores locales, como la activación de células NK y la estimulación de la expresión de moléculas citotóxicas [261].

La IL10 se encuentra elevada en fases muy tempranas de la enfermedad, y puede usarse para predecir el desarrollo de disfunción orgánica [19, 262]. Además, la IL10 se encuentra elevada junto con las de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL6 e IL8 [263].

Por su parte, la IL5 es producida principalmente por los linfocitos TH2 activados y los mastocitos. Es la principal citoquina que induce la diferenciación de los progenitores de eosinófilos, además de mejorar la capacidad efectora de los eosinófilos maduros [264] Otras funciones de la IL-5 son estimular el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Se ha descrito que, con una adecuada estimulación, las células NK pueden producir IL-5 [265], así como las células estromales de médula ósea [264, 266] .La IL-5 ha sido

asociada desde hace tiempo con la inmunopatogenia de varias enfermedades alérgicas, como la rinitis alérgica y el asma, en las que se ha observado un gran aumento en el número de eosinófilos circulantes, en el esófago y el tejido respiratorio de esófago inducidos por esputo e inducidos por el tejido respiratorio [267].

En nuestro estudio se halló que los niveles séricos de IL-5 se correlacionan con la gravedad y la mortalidad. No obstante, no se ha encontrado referencias en la bibliografía respecto al posible papel de la IL-5 en la PA, a excepción de un trabajo de 2014 el que no se observó relación entre los niveles séricos de IL-5 y gravedad de la PA [18].

Perfil TH2

Las citoquinas proinflamatorias han sido estudiadas con detalle, en el contexto de la Pancreatitis Aguda, pero se ha prestado menos atención a los mediadores antiinflamatorios en el inicio de la enfermedad. En este trabajo, se identificó un segundo perfil antiinflamatorio en el inicio de la PA. Cuando se compararon pacientes con PA grave con aquellos con PA leve o moderadamente grave, se encontró que los niveles elevados de GM-CSF, IL4, IL1 β , IL13, se asociaban con una enfermedad leve o moderadamente grave.

El SIRS es seguido por una respuesta antiinflamatoria, conocida como síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS, por sus siglas en inglés), que se manifiesta como PA grave asociada con disfunción orgánica. El sistema inmunitario se regula negativamente durante esta fase, lo que aumenta la susceptibilidad a las infecciones y es una causa importante de morbilidad y

mortalidad en AP [352, 353]. Sin embargo, el CARS no se desencadena hasta días después del inicio de los síntomas de PA. Además, la cohorte de pacientes con niveles elevados de GM-CSF, IL4, IL1 β e IL13 tuvo una mejor evolución clínica.

En este trabajo se describe por primera vez un perfil de citoquinas TH2, en el inicio de la PA, que está asociado con un mejor pronóstico, lo que hipotéticamente podría ser atribuible a una respuesta compensadora antiinflamatoria previa al SIRS, con efectos beneficiosos a largo plazo.

El G-CSF es un importante estimulador de la producción de neutrófilos [160], en los que además regula funciones clave tales como la producción de superóxido y la fagocitosis [269]. Pero por otra parte, tiene una importante actividad antiinflamatoria Actúa inhibiendo la producción o actividad de IL-1, TNF- α , e IFN- γ [270]. También induce un aumento de la producción de IL-4, por parte de los linfocitos T activados [271]. G-CSF por tanto, estimula la producción de neutrófilos al tiempo que mantiene bajo control la respuesta inflamatoria [270].

La IL-4 es producida principalmente por linfocitos TH2, pero también por mastocitos, basófilos y células de la médula ósea [272]. Induce la diferenciación de los linfocitos T Th0 a linfocitos TH2.

Además, actúa inhibiendo la producción de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ e IL-2 por los linfocitos TH1 [275]. También inhibe la actividad de células NK y de macrófagos [276, 277].

La IL-13 es una citoquina estrechamente relacionada con IL-4. La estructura secundaria de la IL-13, con 4 hélices alfa en su estructura, es similar a la IL-4; sin

embargo, solo tiene un 25% de homología de secuencia [274, 280]. Es secretada por células T helper tipo 2 (TH2), linfocitos CD4, linfocitos T, células NKT, mastocitos, basófilos, eosinófilos y células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) [280].

La IL-13 induce en las células inmunitarias efectos antiinflamatorios que son similares a los de la IL-4 [41]. Pero, además, la IL-13 es un mediador importante de los cambios fisiológicos inducidos por la inflamación alérgica en muchos tejidos [41]. Es un mediador de la inflamación alérgica y diferentes enfermedades, incluido el asma [280].

En ratas, el tratamiento con IL-4 e IL-13 revierte la activación de macrófagos inducida por pancreatitis *in vivo* y tiene un efecto moderado en la reducción de la inflamación sistémica asociada a la pancreatitis aguda [354]. .

Análisis de curvas ROC y Ratio IL13/IFN γ

Con el objetivo de analizar la capacidad de diferentes citoquinas para predecir la gravedad de la pancreatitis aguda, realizamos en cálculo de las curvas ROC. A su vez, se establecieron los puntos de corte óptimos para cada ítem en términos de sensibilidad, especificidad, y AUC (Área Bajo la Curva o “*Area Under the Curve*”).

Del análisis de sus curvas ROC, llegamos a la conclusión de que IL6, IFN γ , TNF α , pueden emplearse para la predicción de pancreatitis aguda grave o moderadamente grave.

Por otro lado, los niveles altos de IL4, IL13, y GM-CSF son predictores de una condición clínica favorable.

Con el objetivo de desarrollar una herramienta útil para la predicción de la gravedad de la pancreatitis aguda, basada en el análisis de citoquinas, se analizó que citoquinas tenían una mayor influencia en el desarrollo, o no, de PA grave. Para ello se aplicó un modelo de regresión paso a paso. El modelo arrojó como resultado que una citoquina proinflamatoria y otra antiinflamatoria, IFN- γ e IL13, eran las que tenían un mayor peso en la discriminación entre PA leve y PA grave o moderadamente grave.

A continuación, se calculó la ratio IL13/IFN γ . Se comprobó que no solo es útil para diferenciar entre pancreatitis leve y moderadamente o grave en las primeras 24h, con una alta sensibilidad (75%) y especificidad (96%); si no que además hay diferencias significativas en esta ratio entre pacientes con PA grave y aquellos con PA leve o moderadamente grave, y entre pacientes fallecidos y supervivientes

Esta ratio podría ser una buena herramienta para pronosticar la evolución de los pacientes con PA en las primeras 24 horas tras el inicio de los síntomas.

POLIMORFISMOS GENETICOS EN PANCREATITIS AGUDA

Partimos de la hipótesis de que el perfil de citoquinas y, por lo tanto, la gravedad de PA, está relacionado con las respuestas de cada individuo a través de los receptores de la inmunidad innata a ciertas señales moleculares, con influencia de factores ambientales o genéticos.

Este estudio se ha explorado la relación de los polimorfismos en los genes relacionados con el proceso inflamatorio con el desarrollo y gravedad de la PA.

En un estudio de asociación de genoma completo, la presencia de polimorfismos en los genes *NOD2*, y *RIPK2* se relacionó con lepra lepromatosa [355]. La lepra lepromatosa se caracteriza por una respuesta inmunitaria de tipo humoral, con citoquinas de tipo T TH2 (IL-4 e IL-10) y ausencia de granulomas, que es incapaz de restringir el crecimiento de *Mycobacterium leprae* [356]. Por el contrario, en la lepra tuberculoide hay una respuesta inmunitaria de tipo celular, con expresión de citoquinas de tipo TH1 (IFN- γ e IL-2), respuesta de los linfocitos T al antígeno de *M. leprae* y contención de la infección en granulomas bien desarrollados [356].

Tanto *NOD2* como *RIPK2* desempeñan un papel importante en las respuestas de interferón de tipo I [357]. La unión del ligando a *NOD2* inicia la transducción de señales, que está mediada por *RIPK2* a través de un proceso de ubiquitinación en el que se recluta a *TAK1* [357].

El SNP *NOD2* *rs9302752* está situado aguas arriba del gen y, por lo tanto, puede desregular la actividad del promotor e influir en la expresión del gen [358]. *NOD2* (también conocido como *CARD15*) es un PRR intracelular que reconoce moléculas que contienen muramil dipéptido (MDP), y moléculas de estrés [359]. *RIPK2* codifica una proteína que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa C-terminal (CARD) y es un componente de los complejos de señalización en las rutas inmunitarias tanto innata como adaptativa. Los polimorfismos en *RIPK2* han sido relacionados con enfermedades inflamatorias crónicas, como la enfermedad inflamatoria intestinal [360].

Es por estos antecedentes que se planteó la hipótesis de que la presencia de polimorfismos en *NOD2* *rs9302752* o *RIPK2* *rs42490* podría favorecer la

inflamación del páncreas. Sin embargo, no encontramos ninguna asociación significativa entre estas variantes y la incidencia de la PA.

No obstante, la variante *RIPK2 rs42490* sí que se relaciona con la gravedad de la PA. El alelo *RIPK2 rs42490-G* se asocia con PA grave o moderadamente grave, y con un mayor riesgo de muerte. Una posible explicación es que los portadores del alelo *rs42490-G* desarrollen respuestas de interferón tipo I más potentes, asociadas a un peor pronóstico.

El factor nuclear- κ B (NF- κ B) es un importante regulador de la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmunitaria, la apoptosis y el control del crecimiento celular. Se encuentra implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, citoquinas, radiación ultravioleta, y antígenos bacterianos o virales [199-203]. Desempeña un papel importante en la activación de células después del reconocimiento de patógenos. En dichas células, la señal generada por el receptor activado produce cambios en la expresión génica, induciendo la expresión de moléculas efectoras tales como citoquinas (*v. gr.*, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , LT α , LT β y GM-CSF), quimiocinas (*v. gr.*, IL-8, MIP-1 α , MCP-1, RANTES y eotaxina) y moléculas de adhesión (*v. gr.*, ICAM, VCAM y E-selectina) [361, 362]. Las isoformas p105/p50 de NF- κ B están codificadas por el gen *NFKB1*, localizado en el cromosoma 4q24 [363, 364].

Dado el papel central de NF- κ B en la inflamación, se decidió estudiar un polimorfismo funcional en la región promotora de *NFKB1*, *rs28362491*, también conocido como el polimorfismo de inserción / eliminación ATTG -94. Este polimorfismo en la región promotora de *NFKB1* se ha correlacionado con diversas

enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, asma, SIDA, varios tipos de cáncer y diversas complicaciones diabéticas [365-367].

Nuestros datos parecen descartar un papel para este polimorfismo en la susceptibilidad o gravedad de la PA.

MCP-1 es el quimioatrayente de monocitos más potente [256]. Se ha demostrado que tiene un importante papel en el tráfico de macrófagos y monocitos hacia los sitios de inflamación [254, 255]. Es una quimioquina implicada en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, nefropatía diabética, artritis reumatoide y varias enfermedades infecciosas [255, 256]. Estudios anteriores han demostrado que MCP-1 participa en la respuesta inflamatoria dependiente de macrófagos que caracteriza la pancreatitis [368, 369]].

La variante *MCP1* rs1024611 es un SNP, consistente en la sustitución de A por G en la posición -2578 del gen *MCP1* (*rs1024611*; A> G) [256, 370]. Este polimorfismo se sitúa en la región reguladora del gen, que ve así alterada su función, induciendo un aumento de la expresión génica [370]. Se asocia con niveles séricos más altos de MCP-1 [256, 370]. y una mayor susceptibilidad a una variedad de enfermedades como la neurológica asociada al VIH-1. Trastornos, tuberculosis y aterosclerosis. Trabajos anteriores han demostrado que el alelo *rs1024611*-G de *MCP1* puede agravar la gravedad o la susceptibilidad a la PA elevando el nivel sérico de MCP-1 [371, 372] No obstante, en nuestra cohorte de pacientes no encontramos relación con la incidencia de la pancreatitis ni con su gravedad.

La variante *rs2107538* es un polimorfismo funcional situado en la región promotora proximal del gen *RANTES*, consistente en el cambio de una T por una C

en la posición 403 [373]. Este polimorfismo está asociado a un aumento de la expresión del gen [374]. Está asociado con un mayor riesgo de varias enfermedades inflamatorias como el asma, sarcoidosis y enfermedades infecciosas, incluido el VIH [375-377]. Esta variante, en nuestros pacientes, no se relaciona con la incidencia de la pancreatitis ni con su gravedad

La presencia del alelo A de *IL23R rs11209026* confiere un efecto protector contra varias enfermedades inflamatorias crónicas y/o autoinmunes, incluida la enfermedad de Crohn [42, 378-380], la colitis ulcerosa [379, 381] y la espondilitis anquilosante [382, 383]. Con respecto a la incidencia de PA, nuestros resultados muestran que el alelo *IL23R rs11209026* -A aumenta considerablemente el riesgo de PA.

La activación de los linfocitos T en presencia de IL-23, conduce a la expansión de la subpoblación de linfocitos TH17, productores de IL-17 [384, 385]. Se ha demostrado, a través de la caracterización funcional del SNP *IL23R rs11209026*, que los portadores del alelo A tienen una respuesta TH17 inducida por IL-23 disminuida, con significativamente menos síntesis de IL-17A e IL-22 en respuesta a IL-23, además de estar afectada la señalización a nivel de pSTAT3 [386-389].

Un estudio de *splicing* de RNA, demostró que el alelo A *rs11209026* afecta a un sitio de unión a SF2, elevando la expresión de *IL23RΔ9*, una forma de *splicing* que codifica una variante soluble del receptor, que se secreta de la célula y tiene la capacidad de interferir con la señalización de IL-23 [390].

Un ejemplo es el fracaso en la terapia dirigida contra IL-17 en pacientes de enfermedad de Crohn, que resultó en un aumento de los efectos adversos (Hueber et al., 2012).

Las células TH17 están asociadas con enfermedades autoinmunes [380-382], como esclerosis múltiple, artritis reumatoide y psoriasis [391-393]. Se han ensayado diferentes enfoques terapéuticos dirigidos a las células TH17 o a la citoquina IL-17 que han mostrado resultados prometedores para mejorar la inflamación [394, 395]. Sin embargo, lo que rara vez se toma en consideración es el hecho de que las células TH17 propias de la mucosa intestinal son importantes para la protección de barrera y podrían ser víctimas colaterales de estos enfoques terapéuticos con posibles efectos perjudiciales a largo plazo. Un ejemplo es el fracaso en la terapia dirigida contra IL-17 en pacientes de enfermedad de Crohn, que resultó en un empeoramiento de la condición clínica [396]. Pero además hay pruebas del importante papel de los linfocitos TH17 en la defensa del hospedador contra patógenos en las mucosas [397-399]. En la mucosa intestinal, los linfocitos TH17 también desempeñan funciones protectoras contra las infecciones por bacterias extracelulares [398, 399]. Las células productoras de citoquinas efectoras como la IL-17 y la IL-22 son cruciales para mantener la integridad de la barrera epitelial [400-402]. Las citoquinas IL-17A, IL-17F e IL-22, producidas por las células TH17, actúan induciendo la producción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales y el refuerzo de las uniones estrechas de las células epiteliales [403]. La incapacidad para mantener la integridad inmunológica y epitelial del tracto gastrointestinal da como resultado la translocación de antígenos del lumen intestinal, incluyendo productos microbianos, a la circulación periférica. La

pérdida del linaje de células TH17 en el intestino, como se observa durante la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de inmunodeficiencia de simios (VIS), se asocia con translocación microbiana, disfunción inmunitaria de la mucosa y progresión de la enfermedad [404, 405]. Los linfocitos TH17 también tienen un papel beneficioso al promover la recuperación de la mucosa intestinal y al prevenir la translocación microbiana [406, 407]. Además, las células TH17 también pueden promover la producción de IgA dentro del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) [403].

Se ha sugerido que la translocación de bacterias en la pared intestinal desempeña un papel importante en la patogénesis de la PA [368]. El daño en las células acinares causa la liberación de DAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), que tras su reconocimiento a través de TLRs y NLRP3 por parte de las células presentadoras de antígeno, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias [368]. Las citoquinas proinflamatorias inducen cambios en la permeabilidad de la pared intestinal, lo que favorece la entrada de microorganismos a la circulación [368, 408].

Una consecuencia importante de la translocación de la microflora comensal intestinal a la circulación, es que ésta es capaz de estimular a las células acinares a través de TLR4 y NOD1. La señalización de TLR4 conduce a la activación del inflamasoma y la producción de caspasa 1 e IL-1 β , mientras que la señalización NOD1 da como resultado la activación de NF- κ B, TNF- α , y los factores IFN de tipo I que sostienen la inflamación [368].

La asociación observada entre el alelo A de *IL23R rs11209026* y el aumento de la incidencia de PA puede ser explicada por alteraciones en la susceptibilidad a agentes infecciosos en las mucosas, debido a una respuesta TH17 deficiente, que favorezca la translocación de organismos microbianos en la mucosa intestinal. La entrada de bacterias a la circulación, sumada a la liberación de DAMP después del daño acinar, puede llevar a la liberación excesiva de mediadores proinflamatorios.

Un hallazgo interesante de nuestro trabajo fue la relación epistática existente entre los polimorfismos *IL23R rs11209026* y *TNF rs1800629*. El alelo A de *TNF rs1800629* se ha asociado con un incremento de la expresión de TNF α [409]. Las citoquinas proinflamatorias, incluyendo a TNF α han sido ampliamente estudiadas en el contexto de la PA, estando asociadas a mayor gravedad [18, 225, 410]. Esta asociación de TNF α con un peor pronóstico ha sido confirmada en nuestro estudio de citoquinas.

Respecto a la influencia de las variaciones genéticas estudiadas en con la etiología de la pancreatitis aguda, no se encontró ninguna asociación significativa.

INFLUENCIA DE LAS VARIABLES GENÉTICAS EN LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN SUERO

En nuestro trabajo se han encontrado varias asociaciones significativas entre niveles de citoquinas en suero y gravedad de la pancreatitis aguda; y entre varias variaciones genéticas en genes relacionados con la inflamación y la incidencia y gravedad de la PA. Además, en un trabajo anterior de nuestro grupo, se comprobó que algunas variantes de TLR se relacionan con la gravedad de la pancreatitis, aunque no con su incidencia. En concreto, el genotipo CC de *TLR3 rs377529*, y el

genotipo GG de *TLR6* rs5743795 se asocian con PA grave o moderadamente grave [315]. Por ello se decidió estudiar la influencia de varios polimorfismos relacionados con la inflamación (*RANTES* rs2107538, *NOD2* rs930275, *MCP1* rs1024611, *RIPK2* rs42490, *IL23R* rs11209026, *TNF* rs1800629) y de varios polimorfismos en genes de TLR (*TLR1* rs5743611, *TLR2* rs5743704, *TLR3* rs3775291, *TLR3* rs5743305, *TLR4* rs4986790, *TLR4* rs4986791, *TLR5* rs5744174, *TLR6* rs5743795, *TLR7* rs2302267, *TLR9* rs352140, y *TLR10* rs4129009) con los niveles de citoquinas.

El alelo G de la variante *RIPK2* rs42490 está relacionado con un aumento en los niveles séricos de IFN γ . Este resultado es coherente con nuestros otros hallazgos, el alelo *RIPK2* rs42490-G se asocia con PA grave o moderadamente grave, y con un mayor riesgo de muerte. La variante *RIPK2* rs42490 está asociada a una respuesta a la lepra de tipo TH1 [355]. La proteína RIPK2 está involucrada en la respuesta TH1, la producción de IFN γ , y en la defensa frente a patógenos intracelulares [411]. Por lo tanto, es posible que los resultados observados en nuestro grupo de pacientes se deban a que el alelo *RIPK2* rs42490-G favorezca una mayor producción de IFN γ .

Los portadores de mutación en el SNP *TNF* rs1800629 tienen niveles séricos elevados de IL9, además de menos GM-CSF en suero. El alelo A de *TNF* rs1800629 se ha asociado con un incremento de la expresión de TNF α [409]. El TNF α induce la producción de IL9 [412]. Sin embargo, el TNF α es un potente inductor de la síntesis de GM-CSF [413]. Aunque no hemos detectado directamente un aumento de la expresión de TNF α asociada a este polimorfismo, el aumento de los niveles de IL9 podrían ser explicados por un aumento de los niveles de TNF α . Sin embargo, la

disminución de los niveles de GM-CSF es contradictoria. Quizás pueda ser explicado por asociaciones con otros genes.

Los portadores del alelo *MCP1 rs1024611* -G tienen niveles séricos de IL1b y GM-CSF disminuidos. Hay trabajos anteriores que han demostrado que el alelo *rs1024611*-G de MCP-1 puede agravar la gravedad o la susceptibilidad a la PA mediante la subida del nivel de MCP-1 en suero [371, 372]. En nuestro estudio de citoquinas, IL1b y GM-CSF se asocian a un pronóstico favorable. Una hipótesis es que el alelo *MCP1 rs1024611* -G podría estar favoreciendo una menor liberación de IL1b y GM-CSF a través de mecanismos indirectos, mediados por MPC-1.

Los niveles de GM-CSF están también disminuidos en los individuos portadores del alelo *RANTES rs2107538* -T. En pacientes no encontramos relación con la incidencia de la pancreatitis ni con su gravedad. La variante *rs2107538* es un polimorfismo funcional situado en la región promotora proximal del gen *RANTES*, consistente en el cambio de una T por una C en la posición 403 [373]. Este polimorfismo está asociado a un aumento de los niveles de RANTES [374]. RANTES es una citoquina proinflamatoria producida por los linfocitos T estimulados por un mitógeno o un antígeno [252]. Actúa como un agente quimiotáctico para linfocitos T, monocitos, eosinófilos y a basófilos [253].

Las vías de señalización a través de diversos TLR, en respuesta a MAMP y DAMP, pueden contribuir a distintos perfiles de citoquinas (TH1 o TH2), y pueden verse alteradas por la presencia de polimorfismos genéticos [414-416]. En un trabajo anterior de nuestro grupo, se comprobó que algunas variantes de TLR se relacionan con la gravedad de la pancreatitis, aunque no con su incidencia. En

concreto, el genotipo CC de *TLR3 rs377529*, y el genotipo GG de *TLR6 rs5743795* se asocian con PA grave o moderadamente grave [315]. Por ello se decidió estudiar la influencia de los polimorfismos en genes de TLRs en los niveles de citoquinas.

Se analizaron los siguientes TLR: *TLR1 rs5743611*, *TLR2 rs5743704*, *TLR3 rs3775291*, *TLR3 rs5743305*, *TLR4 rs4986790*, *TLR4 rs4986791*, *TLR5 rs5744174*, *TLR6 rs5743795*, *TLR7 rs2302267*, *TLR9 rs352140*, y *TLR10 rs4129009*.

Fueron varias las asociaciones que se encontraron entre variantes en genes de TLRs, con respecto a los niveles de citoquinas.

Los pacientes portadores del alelo *TLR1 rs5743611-C* muestran un aumento de los niveles de IL12p70. Este polimorfismo se ha asociado con la señalización alterada de NF- κ B y una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 o IL-8 [417]. En un trabajo anterior de nuestro grupo no se encontró relación entre este SNP y la gravedad de la PA [315].

Los niveles de IL1b e IL4 son más bajos en pacientes portadores de mutación en el SNP *TLR6 rs5743795*.

Los niveles de IFN γ son mayores en presencia de mutación en *TLR9 rs352140*, mientras que los de GM-CSF son menores.

El genotipo *TLR6 rs5743795-GG* se asoció con concentraciones de IL1 β e IL4 en suero significativamente más bajas. En nuestro estudio, estas dos citoquinas se asociaron con PA leve. En consecuencia, los portadores del genotipo GG, no mutado, tienen más probabilidades de desarrollar una forma más leve de PA. Este hallazgo es coherente con un estudio anterior de nuestro grupo, que encontró una

asociación entre el genotipo GG y PA leve [315]. Estos hallazgos evidencian la función protectora de TLR6 frente a PA grave, lo que podría estar relacionado con las vías de señalización y de liberación de citoquinas. El polimorfismo *TLR6 rs5743795* se encuentra en una región intrónica [418], pero no se dispone de datos suficientes para determinar la funcionalidad de la proteína [419].

También se ha encontrado una relación significativa de TLR9 con el perfil de citoquinas en PA. En los portadores del alelo *TLR9 rs352140-T* las concentraciones de IFN- γ fueron más altas y las concentraciones de GM-CSF fueron más bajas que en los portadores del genotipo de tipo salvaje. El SNP *TLR9 rs352140* codifica para una mutación silenciosa, por lo que se desconoce como estaría afectando a funcionalidad del TLR9. Una explicación posible es que *TLR9 rs352140* se encuentra en desequilibrio de ligamiento (LD) con otro polimorfismo situado en el intrón 1 (*+1174A/G*) [420, 421]. La presencia de *+1174G* se encuentra asociada con una disminución de la expresión del gen.

CONSIDERACIONES FINALES

Considerando los resultados que hemos obtenido, de nuestro estudio se puede concluir que presentar un perfil de citoquinas asociado a baja respuesta inflamatoria y/o perfil TH2 está asociado a evolución favorable de la pancreatitis aguda. En este sentido proponemos una ratio IL13/IFN γ como un excelente biomarcador para la predicción de enfermedad grave en las primeras 24 horas. Del estudio genético realizado se concluye que el alelo *IL23R rs11209026-A* está asociado con un mayor riesgo de desarrollar PA, lo que pensamos que podría ser debido a una respuesta TH17 deficiente lo que favorecería una disminución del

efecto barrera favoreciendo la translocación de microorganismos a nivel intestinal. Además, el alelo RIPK2 rs42490-G, relacionado con un aumento de los niveles séricos de IFN γ , se asocia con una mayor gravedad de la PA. En resumen, de nuestro estudio se deduce que presentar un perfil genético o serológico asociado a respuesta inflamatoria moderada está asociado a evolución favorable de la pancreatitis aguda, pudiendo constituir nuevos biomarcadores para la estratificación del riesgo en dicha enfermedad.

CONCLUSIONES

De las investigaciones llevadas a cabo en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- ✓ , Altos niveles de las citoquinas IFN γ , TNF α , IL18, IL10, IL5 e IL6 se encuentran asociados a PA grave o moderadamente grave, con un mayor riesgo de fallecimiento, y con una mayor duración del ingreso hospitalario. Por el contrario, niveles elevados de GMCSF, IL1 β , IL4 e IL13 están asociados a una menor gravedad.
- ✓ Del análisis de curvas ROC, se concluye que los niveles de citoquinas IL6, IFN γ , TNF α , pueden emplearse para la predicción de pancreatitis aguda grave o moderadamente grave. Por el contrario, los niveles altos de IL4, IL13, y GM-CSF son predictores de una condición clínica favorable.
- ✓ Establecemos que una ratio IL13/IFN γ reducida es un excelente biomarcador que puede ser empleado en las primeras 24 horas para la predicción de enfermedad grave.
- ✓ El alelo *IL23R rs11209026-A* está asociado con un mayor riesgo de desarrollar PA. El aumento de la incidencia de PA puede ser explicado por una respuesta TH17 deficiente. Este defecto podría provocar una reducción en los niveles de producción de citoquinas TH17 y por tanto una disminución del efecto barrera favoreciendo la translocación de organismos microbianos en la mucosa intestinal.
- ✓ El alelo *RIPK2 rs42490-G* se asocia con una mayor gravedad de la PA, además de con mayor mortalidad, lo que puede estar relacionado con el aumento que induce esta variante en los niveles séricos de IFN γ .

CONCLUSIONES

En resumen, de nuestro estudio se puede concluir que presentar un perfil genético o serológico asociado a baja respuesta inflamatoria y/o perfil TH2 está asociado a evolución favorable de la pancreatitis aguda, pudiendo constituir excelentes biomarcadores para la estratificación del riesgo en dicha enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Real Academia Española, *Diccionario de la lengua española*. 2017.
2. Brüel, A. and F. Geneser, *Geneser histología : 4a. edición*. 2015, México, D.F.: Editorial Médica Panamericana. 754 p.
3. Drake, R.L., et al., *Gray, anatomía para estudiantes* Ed. en español de la 3* ed. 2015, Barcelona: Elsevier España. XXIII, 1161 p.
4. Shier, D., J. Butler, and R. Lewis, *Hole's human anatomy & physiology*. 13th ed ed. 2013, New York: McGraw-Hill. XXIV, 997 p.
5. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Histología básica : texto y atlas*. 12* ed ed. 2015, Buenos Aires etc ; Madrid: Editorial Médica Panamericana. 537 p.
6. Hansen, J.T., et al., *Netter. Anatomía clínica*. 3* ed. 2014, Barcelona etc: Elsevier Masson. XXII, 515 p.
7. Young, B., *Wheater's functional histology : a text and colour atlas*. 5th ed. 2006, Edinburgh?: Churchill Livingstone/Elsevier. x, 437 p.
8. Lowe, M.E., *Structure and function of pancreatic lipase and colipase*. Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 141-58.
9. Konturek, S.J., et al., *Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control*. J Physiol Pharmacol, 2003. **54**(3): p. 293-317.
10. Behrends, J.C., *Physiologie*. Duale Reihe. 2010, Stuttgart: Thieme. XXI, 830 S.
11. Pallagi, P., P. Hegyi, and Z. Rakonczay, Jr., *The Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Ductal Secretion: The Background for Clinicians*. Pancreas, 2015. **44**(8): p. 1211-33.
12. Singer, M.V. and E. Niebergall-Roth, *Secretion from acinar cells of the exocrine pancreas: role of enteropancreatic reflexes and cholecystokinin*. Cell Biol Int, 2009. **33**(1): p. 1-9.
13. Pandiri, A.R., *Overview of exocrine pancreatic pathobiology*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 207-16.
14. Banks, P.A., et al., *Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus*. Gut, 2013. **62**(1): p. 102-11.
15. Banks, P.A., M.L. Freeman, and G. Practice Parameters Committee of the American College of, *Practice guidelines in acute pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(10): p. 2379-400.
16. Swaroop, V.S., S.T. Chari, and J.E. Clain, *Severe acute pancreatitis*. JAMA, 2004. **291**(23): p. 2865-8.

17. Vege, S.S., D.C. Whitcomb, and S. Grover. *Clinical manifestations and diagnosis of acute pancreatitis*. 2018 [cited 2018; Version 32:[Available from: <http://www.uptodate.com>].
18. Nieminen, A., et al., *Circulating cytokines in predicting development of severe acute pancreatitis*. Crit Care, 2014. **18**(3): p. R104.
19. Gunjaca, I., et al., *Circulating cytokine levels in acute pancreatitis-model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity*. Inflammation, 2012. **35**(2): p. 758-63.
20. Chen, C.C., et al., *Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 213-8.
21. Gwozdz, G.P., et al., *Comparative evaluation of the diagnosis of acute pancreatitis based on serum and urine enzyme assays*. Clin Chim Acta, 1990. **187**(3): p. 243-54.
22. Dervenis, C., et al., *Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini consensus conference*. Int J Pancreatol, 1999. **25**(3): p. 195-210.
23. Tenner, S., et al., *Urinary trypsinogen activation peptide (TAP) predicts severity in patients with acute pancreatitis*. Int J Pancreatol, 1997. **21**(2): p. 105-10.
24. Yadav, D., N. Agarwal, and C.S. Pitchumoni, *A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(6): p. 1309-18.
25. Fortson, M.R., S.N. Freedman, and P.D. Webster, 3rd, *Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 1995. **90**(12): p. 2134-9.
26. Vege, S.S., D. Yadav, and S.T. Chari, *Pancreatitis*. Gi Epidemiology, 2007: p. 221-225.
27. Frey, C.F., et al., *The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001*. Pancreas, 2006. **33**(4): p. 336-44.
28. Toouli, J., et al., *Guidelines for the management of acute pancreatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17** Suppl: p. S15-39.
29. Yadav, D. and A.B. Lowenfels, *Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review*. Pancreas, 2006. **33**(4): p. 323-30.
30. Banks, P.A., *Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis*. Gastrointest Endosc, 2002. **56**(6 Suppl): p. S226-30.
31. Frossard, J.-L., M.L. Steer, and C.M. Pastor, *Acute pancreatitis*. The Lancet, 2008. **371**(9607): p. 143-152.
32. Weiss, F.U., F. Laemmerhirt, and M.M. Lerch, *Etiology and Risk Factors of Acute and Chronic Pancreatitis*. Visc Med, 2019. **35**(2): p. 73-81.

33. Forsmark, C.E., et al., *AGA Institute technical review on acute pancreatitis*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 2022-44.
34. Moreau, J.A., et al., *Gallstone pancreatitis and the effect of cholecystectomy: a population-based cohort study*. Mayo Clin Proc, 1988. **63**(5): p. 466-73.
35. European Association for the Study of the Liver . Electronic address, e.e.e., *EASL Clinical Practice Guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of gallstones*. J Hepatol, 2016. **65**(1): p. 146-181.
36. Lerch, M.M., et al., *Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum*. Gastroenterology, 1993. **104**(3): p. 853-61.
37. Yang, A.L., et al., *Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States*. Arch Intern Med, 2008. **168**(6): p. 649-56.
38. Kim, T.K. and T. Maniatis, *Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway*. Science, 1996. **273**(5282): p. 1717-9.
39. Sekimoto, M., et al., *JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006. **13**(1): p. 10-24.
40. Kahaleh, M. and M. Freeman, *Prevention and management of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography complications*. Clin Endosc, 2012. **45**(3): p. 305-12.
41. Minty, A., et al., *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 248-50.
42. Li, Y., et al., *Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and Crohn's disease susceptibility: a meta-analysis*. Inflamm Res, 2010. **59**(8): p. 607-14.
43. Scherer, J., et al., *Issues in hypertriglyceridemic pancreatitis: an update*. J Clin Gastroenterol, 2014. **48**(3): p. 195-203.
44. McArthur, K.E., *Review article: drug-induced pancreatitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1996. **10**(1): p. 23-38.
45. Sadr-Azodi, O., et al., *Association of oral glucocorticoid use with an increased risk of acute pancreatitis: a population-based nested case-control study*. JAMA Intern Med, 2013. **173**(6): p. 444-9.
46. Vege, S.S., D.C. Whitcomb, and S. Grover. *Etiology of acute pancreatitis*. 2018 [cited 2018; Version 32:[Available from: <http://www.uptodate.com>].
47. Howes, N., et al., *Cationic trypsinogen mutations and pancreatitis*. Gastroenterol Clin North Am, 2004. **33**(4): p. 767-87.
48. DiMagno, M.J. and E.P. DiMagno, *Chronic pancreatitis*. Curr Opin Gastroenterol, 2005. **21**(5): p. 544-54.

49. Rosendahl, J., et al., *Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 78-82.
50. Rattner, D.W., *Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **219**: p. 6-9.
51. Lerch, M.M. and F.S. Gorelick, *Models of acute and chronic pancreatitis*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1180-93.
52. Dufour, M.C. and M.D. Adamson, *The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis*. Pancreas, 2003. **27**(4): p. 286-90.
53. Bess, M.A., A.J. Edis, and J.A. van Heerden, *Hyperparathyroidism and pancreatitis. Chance or a causal association?* JAMA, 1980. **243**(3): p. 246-7.
54. *Mechanisms of alcoholic pancreatitis. Proceedings of a conference. Chicago, Illinois, USA, November 2002*. Pancreas, 2003. **27**(4): p. 281-355.
55. Toskes, P.P., *Hyperlipidemic pancreatitis*. Gastroenterol Clin North Am, 1990. **19**(4): p. 783-91.
56. Vege, S.S., D.C. Whitcomb, and S. Grover. *Pathogenesis of acute pancreatitis*. 2018 [cited 2018; Version 32:[Available from: <http://www.uptodate.com>].
57. Steer, M.L., *Pathogenesis of acute pancreatitis*. Digestion, 1997. **58 Suppl 1**: p. 46-9.
58. Steer, M.L. and J. Meldolesi, *The cell biology of experimental pancreatitis*. N Engl J Med, 1987. **316**(3): p. 144-50.
59. Grady, T., et al., *Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 1): p. G20-6.
60. Saluja, A.K., et al., *Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B*. Gastroenterology, 1997. **113**(1): p. 304-10.
61. Gukovsky, I., et al., *Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 1): p. G1402-14.
62. Hietaranta, A.J., et al., *Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 388-95.
63. Rakonczay, Z., Jr., et al., *The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis*. Gut, 2008. **57**(2): p. 259-67.
64. Huang, H., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice*. Gastroenterology, 2013. **144**(1): p. 202-10.
65. Prinz, R.A., *Mechanisms of acute pancreatitis. Vascular etiology*. Int J Pancreatol, 1991. **9**: p. 31-8.

66. Klar, E., et al., *Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy*. Br J Surg, 1990. **77**(11): p. 1205-10.
67. Toyama, M.T., et al., *Ischaemia-reperfusion mechanisms in acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **219**: p. 20-3.
68. Rinderknecht, H., *Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation?* Int J Pancreatol, 1988. **3**(2-3): p. 105-12.
69. Kingsnorth, A., *Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis*. Gut, 1997. **40**(1): p. 1-4.
70. Sweiry, J.H. and G.E. Mann, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **219**: p. 10-5.
71. Dawra, R., et al., *Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(6): p. 2210-2217.e2.
72. Schmid, S.W., et al., *The role of infection in acute pancreatitis*. Gut, 1999. **45**(2): p. 311-6.
73. Bradley, E.L., 3rd, *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**(5): p. 586-90.
74. Marshall, J.C., et al., *Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome*. Crit Care Med, 1995. **23**(10): p. 1638-52.
75. *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**(6): p. 864-74.
76. Mofidi, R., et al., *Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis*. Br J Surg, 2006. **93**(6): p. 738-44.
77. Capurso, G., et al., *Role of the gut barrier in acute pancreatitis*. J Clin Gastroenterol, 2012. **46 Suppl**: p. S46-51.
78. Halonen, K.I., et al., *Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis*. Crit Care Med, 2002. **30**(6): p. 1274-9.
79. Petrov, M.S., et al., *Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis*. Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 813-20.
80. Dejong, C.H., J.W. Greve, and P.B. Soeters, *Nutrition in patients with acute pancreatitis*. Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(4): p. 251-6.

81. Uhl, W., et al., *IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis*. *Pancreatology*, 2002. **2**(6): p. 565-73.
82. Golub, R., F. Siddiqi, and D. Pohl, *Role of antibiotics in acute pancreatitis: A meta-analysis*. *J Gastrointest Surg*, 1998. **2**(6): p. 496-503.
83. Isenmann, R., et al., *Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(4): p. 997-1004.
84. Yousaf, M., K. McCallion, and T. Diamond, *Management of severe acute pancreatitis*. *Br J Surg*, 2003. **90**(4): p. 407-20.
85. Mier, J., et al., *Early versus late necrosectomy in severe necrotizing pancreatitis*. *Am J Surg*, 1997. **173**(2): p. 71-5.
86. Carter, C.R., C.J. McKay, and C.W. Imrie, *Percutaneous necrosectomy and sinus tract endoscopy in the management of infected pancreatic necrosis: an initial experience*. *Ann Surg*, 2000. **232**(2): p. 175-80.
87. Baron, T.H., et al., *Endoscopic therapy for organized pancreatic necrosis*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(3): p. 755-64.
88. Lilja, H.E., A. Leppaniemi, and E. Kemppainen, *Utilization of intensive care unit resources in severe acute pancreatitis*. *JOP*, 2008. **9**(2): p. 179-84.
89. Yadav, D. and A.B. Lowenfels, *The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(6): p. 1252-61.
90. Ranson, J.H., et al., *Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis*. *Surg Gynecol Obstet*, 1974. **139**(1): p. 69-81.
91. Knaus, W.A., et al., *APACHE II: a severity of disease classification system*. *Crit Care Med*, 1985. **13**(10): p. 818-29.
92. Yang, C.J., et al., *Predictors of severe and critical acute pancreatitis: a systematic review*. *Dig Liver Dis*, 2014. **46**(5): p. 446-51.
93. Muddana, V., et al., *Elevated serum creatinine as a marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis*. *Am J Gastroenterol*, 2009. **104**(1): p. 164-70.
94. Koutroumpakis, E., et al., *Admission Hematocrit and Rise in Blood Urea Nitrogen at 24 h Outperform other Laboratory Markers in Predicting Persistent Organ Failure and Pancreatic Necrosis in Acute Pancreatitis: A Post Hoc Analysis of Three Large Prospective Databases*. *Am J Gastroenterol*, 2015. **110**(12): p. 1707-16.
95. Bhattacharya, S.K., et al., *Soft tissue calcium and magnesium content in acute pancreatitis in the dog: calcium accumulation, a mechanism for hypocalcemia in acute pancreatitis*. *J Lab Clin Med*, 1985. **105**(4): p. 422-7.

96. Mentula, P., et al., *Plasma anti-inflammatory cytokines and monocyte human leucocyte antigen-DR expression in patients with acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(2): p. 178-87.
97. Abrams, S.T., et al., *Human CRP defends against the toxicity of circulating histones*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2495-502.
98. Puolakkainen, P., et al., *C-reactive protein (CRP) and serum phospholipase A2 in the assessment of the severity of acute pancreatitis*. Gut, 1987. **28**(6): p. 764-71.
99. Pooran, N., et al., *Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis*. J Clin Gastroenterol, 2003. **37**(3): p. 263-6.
100. Surbatovic, M. and S. Radakovic, *Tumor necrosis factor-alpha levels early in severe acute pancreatitis: is there predictive value regarding severity and outcome?* J Clin Gastroenterol, 2013. **47**(7): p. 637-43.
101. Paaanen, H., et al., *Serum tumour necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity of acute pancreatitis*. Br J Surg, 1995. **82**(2): p. 271-3.
102. Digalakis, M.K., et al., *Serum profiles of C-reactive protein, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in patients with acute pancreatitis*. HPB Surg, 2009. **2009**: p. 878490.
103. Viedma, J.A., et al., *Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A*. Gut, 1992. **33**(9): p. 1264-7.
104. Brivet, F.G., D. Emilie, and P. Galanaud, *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**(4): p. 749-55.
105. Mentula, P., et al., *Early prediction of organ failure by combined markers in patients with acute pancreatitis*. Br J Surg, 2005. **92**(1): p. 68-75.
106. Fistic, E., et al., *The Role of IL-6, 8, and 10, sTNFr, CRP, and Pancreatic Elastase in the Prediction of Systemic Complications in Patients with Acute Pancreatitis*. Gastroenterol Res Pract, 2013. **2013**: p. 282645.
107. Gross, V., et al., *Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis*. Eur J Clin Invest, 1992. **22**(3): p. 200-3.
108. Shokuhi, S., et al., *Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis*. Br J Surg, 2002. **89**(5): p. 566-72.
109. Mayer, J., et al., *Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications*. Gut, 2000. **47**(4): p. 546-52.
110. Simovic, M.O., et al., *Anti-inflammatory cytokine response and clinical outcome in acute pancreatitis*. Crit Care Med, 1999. **27**(12): p. 2662-5.

111. Ueda, T., et al., *Significant elevation of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with acute pancreatitis*. *Pancreas*, 1996. **12**(1): p. 76-83.
112. Espinosa, L., et al., *Soluble angiogenic factors in patients with acute pancreatitis*. *J Clin Gastroenterol*, 2011. **45**(7): p. 630-7.
113. Sporek, M., et al., *Determination of hepatocyte growth factor at early phase of acute pancreatitis*. *Folia Med Cracov*, 2013. **53**(1): p. 87-95.
114. Muller, C.A., et al., *Role of procalcitonin and granulocyte colony stimulating factor in the early prediction of infected necrosis in severe acute pancreatitis*. *Gut*, 2000. **46**(2): p. 233-8.
115. Rau, B., et al., *Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications*. *Crit Care Med*, 2001. **29**(8): p. 1556-62.
116. Rau, B., et al., *CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications*. *Intensive Care Med*, 2003. **29**(4): p. 622-9.
117. Sakai, Y., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(3): p. 725-36.
118. Gregoric, P., et al., *Interleukin-12 as a predictor of outcome in patients with severe acute pancreatitis*. *Hepatogastroenterology*, 2014. **61**(129): p. 208-11.
119. Ueda, T., et al., *Serum interleukin-15 level is a useful predictor of the complications and mortality in severe acute pancreatitis*. *Surgery*, 2007. **142**(3): p. 319-26.
120. Frossard, J.L., et al., *In vivo evidence for the role of GM-CSF as a mediator in acute pancreatitis-associated lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **283**(3): p. L541-8.
121. Wacker, C., et al., *Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet Infect Dis*, 2013. **13**(5): p. 426-35.
122. Mofidi, R., et al., *The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: systematic review*. *Surgery*, 2009. **146**(1): p. 72-81.
123. Kylanpaa-Back, M.L., et al., *Procalcitonin, soluble interleukin-2 receptor, and soluble E-selectin in predicting the severity of acute pancreatitis*. *Crit Care Med*, 2001. **29**(1): p. 63-9.
124. Rau, B.M., et al., *Early assessment of pancreatic infections and overall prognosis in severe acute pancreatitis by procalcitonin (PCT): a prospective international multicenter study*. *Ann Surg*, 2007. **245**(5): p. 745-54.
125. Karlsson, S., et al., *Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study*. *Crit Care*, 2010. **14**(6): p. R205.

126. Donadello, K., et al., *Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a prognostic biomarker in critically ill patients*. J Crit Care, 2014. **29**(1): p. 144-9.
127. Uusitalo-Seppala, R., et al., *Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in patients with suspected infection in the emergency room: a prospective cohort study*. J Intern Med, 2012. **272**(3): p. 247-56.
128. Backes, Y., et al., *Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review*. Intensive Care Med, 2012. **38**(9): p. 1418-28.
129. Lipinski, M., et al., *Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) in patients with acute pancreatitis (AP) - Progress in prediction of AP severity*. Pancreatology, 2017. **17**(1): p. 24-29.
130. Nikkola, A., et al., *Plasma Level of Soluble Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor Predicts the Severity of Acute Alcohol Pancreatitis*. Pancreas, 2017. **46**(1): p. 77-82.
131. Zhang, H., P. Damas, and J.C. Preiser, *The long way of biomarkers: from bench to bedside*. Intensive Care Med, 2010. **36**(4): p. 565-6.
132. Uusitalo-Seppala, R., et al., *Pentraxin 3 (PTX3) is associated with severe sepsis and fatal disease in emergency room patients with suspected infection: a prospective cohort study*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53661.
133. Kusnierz-Cabala, B., et al., *Plasma pentraxin 3 concentrations in patients with acute pancreatitis*. Clin Lab, 2013. **59**(9-10): p. 1003-8.
134. Deng, L.H., et al., *Plasma cytokines can help to identify the development of severe acute pancreatitis on admission*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(28): p. e7312.
135. Kaufmann, P., et al., *Increased plasma concentrations of circulating intercellular adhesion molecule-1 (cICAM-1) in patients with necrotizing pancreatitis*. Immunobiology, 1996. **195**(2): p. 209-19.
136. Powell, J.J., et al., *Endothelial-derived selectins in the development of organ dysfunction in acute pancreatitis*. Crit Care Med, 2001. **29**(3): p. 567-72.
137. Zhu, H.H. and L.L. Jiang, *Serum inter-cellular adhesion molecule 1 is an early marker of diagnosis and prediction of severe acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(20): p. 2554-60.
138. Dabrowski, A., et al., *Increased expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on peripheral blood neutrophils in acute pancreatitis*. Adv Med Sci, 2014. **59**(1): p. 102-7.
139. Chen, Y., et al., *Endothelial markers are associated with pancreatic necrosis and overall prognosis in acute pancreatitis: A preliminary cohort study*. Pancreatology, 2017. **17**(1): p. 45-50.

140. Maksimow, M., et al., *Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis**. Crit Care Med, 2014. **42**(12): p. 2556-64.
141. Whitcomb, D.C., et al., *Angiopoietin-2, a regulator of vascular permeability in inflammation, is associated with persistent organ failure in patients with acute pancreatitis from the United States and Germany*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(10): p. 2287-92.
142. Kylanpaa-Back, M.L., et al., *Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(10): p. 1100-7.
143. Lindstrom, O., et al., *Elevated levels of the complement regulator protein CD59 in severe acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(3): p. 350-5.
144. Nukarinen, E., et al., *Association of Matrix Metalloproteinases -7, -8 and -9 and TIMP -1 with Disease Severity in Acute Pancreatitis. A Cohort Study*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161480.
145. Chen, P., et al., *Serum matrix metalloproteinase 9 as a marker for the assessment of severe acute pancreatitis*. Tohoku J Exp Med, 2006. **208**(3): p. 261-6.
146. Mentula, P., et al., *Decreased HLA (human leucocyte antigen)-DR expression on peripheral blood monocytes predicts the development of organ failure in patients with acute pancreatitis*. Clin Sci (Lond), 2003. **105**(4): p. 409-17.
147. Yasuda, T., et al., *Significant increase of serum high-mobility group box chromosomal protein 1 levels in patients with severe acute pancreatitis*. Pancreas, 2006. **33**(4): p. 359-63.
148. Kocsis, A.K., et al., *Plasma concentrations of high-mobility group box protein 1, soluble receptor for advanced glycation end-products and circulating DNA in patients with acute pancreatitis*. Pancreatology, 2009. **9**(4): p. 383-91.
149. Li, N., et al., *The Role of Serum High Mobility Group Box 1 and Interleukin-6 Levels in Acute Pancreatitis: A Meta-Analysis*. J Cell Biochem, 2018. **119**(1): p. 616-624.
150. Lindstrom, O., et al., *Circulating levels of a soluble form of receptor for advanced glycation end products and high-mobility group box chromosomal protein 1 in patients with acute pancreatitis*. Pancreas, 2009. **38**(8): p. e215-20.
151. Gornik, O., et al., *Evaluation of cell-free DNA in plasma and serum as early predictors of severity in acute pancreatitis*. Pancreas, 2011. **40**(5): p. 787-8.
152. Liu, T., et al., *Accuracy of circulating histones in predicting persistent organ failure and mortality in patients with acute pancreatitis*. Br J Surg, 2017. **104**(9): p. 1215-1225.
153. Chen, Q., et al., *Circulating nucleosomes as a predictor of sepsis and organ dysfunction in critically ill patients*. Int J Infect Dis, 2012. **16**(7): p. e558-64.

154. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. *Nature*, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
155. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(12): p. 826-37.
156. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(1): p. 37-49.
157. Pillay, J., et al., *Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(20): p. 3813-27.
158. Ng, L.G., R. Ostuni, and A. Hidalgo, *Heterogeneity of neutrophils*. *Nature Reviews Immunology*, 2019.
159. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood*, 2010. **116**(4): p. 625-7.
160. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. *Blood*, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
161. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
162. Repo, H. and J.M. Harlan, *Mechanisms and consequences of phagocyte adhesion to endothelium*. *Ann Med*, 1999. **31**(3): p. 156-65.
163. Liu, F.C., et al., *Role of neutrophil extracellular traps following injury*. *Shock*, 2014. **41**(6): p. 491-8.
164. Frossard, J.L., et al., *The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(3): p. 694-701.
165. Gukovskaya, A.S., et al., *Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(4): p. 974-84.
166. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, *Macrophages: development and tissue specialization*. *Annu Rev Immunol*, 2015. **33**: p. 643-75.
167. Xue, J., V. Sharma, and A. Habtezion, *Immune cells and immune-based therapy in pancreatitis*. *Immunol Res*, 2014. **58**(2-3): p. 378-86.
168. Siouti, E. and E. Andreakos, *The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis*. *Biochemical Pharmacology*, 2019.
169. Waisman, A., et al., *Dendritic cells as gatekeepers of tolerance*. *Seminars in Immunopathology*, 2017. **39**(2): p. 153-163.

170. McKenna, K., A.-S. Beignon, and N. Bhardwaj, *Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(1): p. 17-27.
171. Bedrosian, A.S., et al., *Dendritic cells promote pancreatic viability in mice with acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(5): p. 1915-26 e1-14.
172. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Mast cell ontogeny: an historical overview*. *Immunol Lett*, 2014. **159**(1-2): p. 11-4.
173. Andersson, C., et al., *Revisiting the role of the mast cell in asthma*. *Curr Opin Pulm Med*, 2016. **22**(1): p. 10-7.
174. Bischoff, S.C., *Mast cells in gastrointestinal disorders*. *European Journal of Pharmacology*, 2016. **778**: p. 139-145.
175. Galli, S.J. and M. Tsai, *Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(7): p. 1843-51.
176. Abraham, S.N. and M. Arock, *Mast cells and basophils in innate immunity*. *Semin Immunol*, 1998. **10**(5): p. 373-81.
177. Dib, M., et al., *Role of mast cells in the development of pancreatitis-induced multiple organ dysfunction*. *Br J Surg*, 2002. **89**(2): p. 172-8.
178. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. *Int Rev Immunol*, 2011. **30**(1): p. 16-34.
179. Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell*. 4^o Edition ed. 2002, New York: Garland Science.
180. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 821-32.
181. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
182. Franchi, L., et al., *Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense*. *Immunol Rev*, 2009. **227**(1): p. 106-28.
183. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
184. Inohara, N., et al., *Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2551-4.
185. Chen, G., et al., *NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 365-98.
186. Inohara, N., et al., *An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 27823-31.

187. Kobayashi, K., et al., *RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 194-9.
188. Girardin, S.E., et al., *CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 736-42.
189. Pauleau, A.L. and P.J. Murray, *Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7531-9.
190. Opitz, B., et al., *Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 484-90.
191. Hasegawa, M., et al., *A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 373-83.
192. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
193. Hansson, G.K. and K. Edfeldt, *Toll to be paid at the gateway to the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1085-7.
194. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2015. **109**: p. 14 12 1-10.
195. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. Int Immunol, 2009. **21**(4): p. 317-37.
196. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
197. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
198. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
199. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
200. Brasier, A.R., *The NF-kappaB regulatory network*. Cardiovasc Toxicol, 2006. **6**(2): p. 111-30.
201. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
202. Gilmore, T.D., *The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6842-4.
203. Tian, B. and A.R. Brasier, *Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network*. Recent Prog Horm Res, 2003. **58**: p. 95-130.

204. Albeni, B.C. and M.P. Mattson, *Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity*. Synapse, 2000. **35**(2): p. 151-9.
205. Meffert, M.K., et al., *NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior*. Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1072-8.
206. Chandel, N.S., et al., *Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1013-21.
207. Fitzgerald, D.C., et al., *Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **116**(1-2): p. 59-68.
208. Renard, P., et al., *Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation*. Biochem Pharmacol, 1997. **53**(2): p. 149-60.
209. Qin, H., et al., *LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3114-22.
210. Takemoto, Y., et al., *Increased JNK, AP-1 and NF-kappa B DNA binding activities in isoproterenol-induced cardiac remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(11): p. 2017-30.
211. Hargrave, B.Y., et al., *Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB in transiently cotransfected heart cells*. Cardiovasc Toxicol, 2003. **3**(2): p. 141-51.
212. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 86.
213. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
214. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
215. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
216. Fujita, T., et al., *The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers*. Genes Dev, 1993. **7**(7B): p. 1354-63.
217. Franzoso, G., et al., *The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 339-42.
218. Bours, V., et al., *The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers*. Cell, 1993. **72**(5): p. 729-39.
219. Jacobs, M.D. and S.C. Harrison, *Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex*. Cell, 1998. **95**(6): p. 749-58.

220. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
221. Bonizzi, G., et al., *Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers*. EMBO J, 2004. **23**(21): p. 4202-10.
222. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
223. Sah, R.P., R.K. Dawra, and A.K. Saluja, *New insights into the pathogenesis of pancreatitis*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(5): p. 523-30.
224. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *Roitt's essential immunology*. 12th ed. Essentials. 2011, Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. xiii, 546 p.
225. Norman, J., *The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis*. Am J Surg, 1998. **175**(1): p. 76-83.
226. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
227. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
228. Cavaillon, J.M., *Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001. **47**(4): p. 695-702.
229. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
230. Murzin, A.G., A.M. Lesk, and C. Chothia, *beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors*. J Mol Biol, 1992. **223**(2): p. 531-43.
231. Gosavi, S., et al., *Extracting function from a beta-trefoil folding motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10384-9.
232. Scholmerich, J., *Interleukins in acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **219**: p. 37-42.
233. Dao, T., et al., *Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells*. Cell Immunol, 1996. **173**(2): p. 230-5.
234. Contassot, E., H.D. Beer, and L.E. French, *Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13590.
235. Billiau, A. and P. Matthys, *Interferon-gamma: a historical perspective*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 97-113.
236. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.

237. Lees, J.R., *Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 18-26.
238. Norman, J.G., G.W. Fink, and M.G. Franz, *Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression*. Arch Surg, 1995. **130**(9): p. 966-70.
239. Ramudo, L., et al., *Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction*. J Pathol, 2005. **206**(1): p. 9-16.
240. Cano NF, M.C., *Las quimiocinas: citoquinas proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular*. IATREIA, 2001. **14**(1): p. 57-72.
241. Malleo, G., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence*. Shock, 2007. **28**(2): p. 130-40.
242. Castell, J.V., et al., *Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes*. FEBS Lett, 1989. **242**(2): p. 237-9.
243. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*. Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 25-9.
244. Chen, Q., et al., *Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1299-308.
245. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 448-57.
246. Adams, D.H. and A.R. Lloyd, *Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines*. Lancet, 1997. **349**(9050): p. 490-5.
247. Remick, D.G., *Interleukin-8*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S466-7.
248. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
249. Nolan, K.F., D.R. Greaves, and H. Waldmann, *The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci*. Genomics, 1998. **51**(1): p. 161-3.
250. Okamura, H., et al., *Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(3): p. 259-64.
251. Takeda, K., et al., *Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 383-90.
252. Maghazachi, A.A., A. Al-Aoukaty, and T.J. Schall, *CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 315-9.
253. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.

254. Melgarejo, E., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 998-1001.
255. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
256. Pham, M.H., et al., *The rs1024611 regulatory region polymorphism is associated with CCL2 allelic expression imbalance*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49498.
257. Kumar, S.N. and J.M. Boss, *Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1*. Mol Immunol, 2000. **37**(11): p. 623-32.
258. Said, E.A., et al., *Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 452-9.
259. Li, X., et al., *IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33628.
260. Jaffer, U., R.G. Wade, and T. Gourlay, *Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review*. HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth, 2010. **2**(3): p. 161-75.
261. Mocellin, S., et al., *The dual role of IL-10*. Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 36-43.
262. Kylanpaa, L., Z. Rakonczay, Jr., and D.A. O'Reilly, *The clinical course of acute pancreatitis and the inflammatory mediators that drive it*. Int J Inflam, 2012. **2012**: p. 360685.
263. Rodriguez-Gaspar, M., et al., *Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients*. Cytokine, 2001. **15**(4): p. 232-6.
264. Dubucquoi, S., et al., *Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 703-8.
265. Warren, H.S., et al., *Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5144-52.
266. Hogan, M.B., D. Piktel, and K.S. Landreth, *IL-5 production by bone marrow stromal cells: implications for eosinophilia associated with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(2): p. 329-36.
267. Shen, H.H., et al., *A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3296-305.
268. Sanderson, C.J., *Interleukin-5, eosinophils, and disease*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3101-9.
269. Roberts, A.W., *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!* Growth Factors, 2005. **23**(1): p. 33-41.

270. Hartung, T., *Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor*. *Curr Opin Hematol*, 1998. **5**(3): p. 221-5.
271. Malashchenko, V.V., et al., *Direct anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on activation and functional properties of human T cell subpopulations in vitro*. *Cell Immunol*, 2018. **325**: p. 23-32.
272. Luzina, I.G., et al., *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives"*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(4): p. 753-64.
273. Sokol, C.L., et al., *A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 310-8.
274. Wang, T. and C.J. Secombes, *The evolution of IL-4 and IL-13 and their receptor subunits*. *Cytokine*, 2015. **75**(1): p. 8-13.
275. de Boer, B.A., et al., *Antigen-stimulated IL-4, IL-13 and IFN-gamma production by human T cells at a single-cell level*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(10): p. 3154-60.
276. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. *J Immunol*, 1990. **145**(11): p. 3796-806.
277. Oswald, I.P., et al., *IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity*. *J Immunol*, 1992. **148**(11): p. 3578-82.
278. McKenzie, A.N., et al., *Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(8): p. 3735-9.
279. Morgan, J.G., et al., *The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(19): p. 5173-9.
280. Rael, E.L. and R.F. Lockey, *Interleukin-13 signaling and its role in asthma*. *World Allergy Organ J*, 2011. **4**(3): p. 54-64.
281. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
282. Chatila, T.A., *Role of regulatory T cells in human diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(5): p. 949-59; quiz 960.
283. Demols, A., et al., *CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(3): p. 582-90.
284. Dabrowski, A., et al., *Monocyte subsets and natural killer cells in acute pancreatitis*. *Pancreatology*, 2008. **8**(2): p. 126-34.
285. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.

286. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cell Mol Immunol, 2019.
287. Rahimi, K., et al., *Targeting the balance of T helper cell responses by curcumin in inflammatory and autoimmune states*. Autoimmun Rev, 2019.
288. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
289. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
290. Dabrowski, A., et al., *Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5686-90.
291. Gallmeier, E., et al., *JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells*. J Cell Physiol, 2005. **203**(1): p. 209-16.
292. McKay, C., C.W. Imrie, and J.N. Baxter, *Mononuclear phagocyte activation and acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **219**: p. 32-6.
293. Shrivastava, P. and M. Bhatia, *Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(32): p. 3995-4002.
294. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. **216**(2): p. 117-34.
295. Wilson, P.G., M. Manji, and J.P. Neoptolemos, *Acute pancreatitis as a model of sepsis*. J Antimicrob Chemother, 1998. **41 Suppl A**: p. 51-63.
296. Menger, M.D., T. Plusczyk, and B. Vollmar, *Microcirculatory derangements in acute pancreatitis*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2001. **8**(3): p. 187-94.
297. Beger, H.G., et al., *Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study*. Gastroenterology, 1986. **91**(2): p. 433-8.
298. Singer, M., et al., *Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation*. Lancet, 2004. **364**(9433): p. 545-8.
299. Makhija, R. and A.N. Kingsnorth, *Cytokine storm in acute pancreatitis*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002. **9**(4): p. 401-10.
300. Bone, R.C., *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS*. Crit Care Med, 1996. **24**(7): p. 1125-8.
301. Ward, N.S., B. Casserly, and A. Ayala, *The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients*. Clin Chest Med, 2008. **29**(4): p. 617-25, viii.

302. Li, J.P., et al., *Immunosuppression and the infection caused by gut mucosal barrier dysfunction in patients with early severe acute pancreatitis*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013. **18**: p. 892-900.
303. Pan, T., et al., *Monocyte programmed death ligand-1 expression is an early marker for predicting infectious complications in acute pancreatitis*. *Crit Care*, 2017. **21**(1): p. 186.
304. Christophi, C., F. McDermott, and E.S. Hughes, *Prognostic significance of the absolute lymphocyte count in acute pancreatitis*. *Am J Surg*, 1985. **150**(3): p. 295-6.
305. Takeyama, Y., et al., *Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death*. *J Gastrointest Surg*, 2000. **4**(4): p. 379-87.
306. Oiva, J., et al., *Patients with acute pancreatitis complicated by organ failure show highly aberrant monocyte signaling profiles assessed by phospho-specific flow cytometry*. *Crit Care Med*, 2010. **38**(8): p. 1702-8.
307. Oiva, J., et al., *Acute pancreatitis with organ dysfunction associates with abnormal blood lymphocyte signaling: controlled laboratory study*. *Crit Care*, 2010. **14**(6): p. R207.
308. Oiva, J., et al., *Patients with acute pancreatitis complicated by organ dysfunction show abnormal peripheral blood polymorphonuclear leukocyte signaling*. *Pancreatology*, 2013. **13**(2): p. 118-24.
309. Curley, P.J., et al., *Reduction in circulating levels of CD4-positive lymphocytes in acute pancreatitis: relationship to endotoxin, interleukin 6 and disease severity*. *Br J Surg*, 1993. **80**(10): p. 1312-5.
310. Pezzilli, R., et al., *Behavior of serum soluble interleukin-2 receptor, soluble CD8 and soluble CD4 in the early phases of acute pancreatitis*. *Digestion*, 1994. **55**(4): p. 268-73.
311. Tenner, S., et al., *American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis*. *Am J Gastroenterol*, 2013. **108**(9): p. 1400-15; 1416.
312. Working Group, I.A.P.A.P.A.A.P.G., *IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis*. *Pancreatology*, 2013. **13**(4 Suppl 2): p. e1-15.
313. Mayes, M.D., et al., *ImmunoChip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis*. *Am J Hum Genet*, 2014. **94**(1): p. 47-61.
314. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(3): p. 559-75.
315. Matas-Cobos, A.M., et al., *The role of Toll-like receptor polymorphisms in acute pancreatitis occurrence and severity*. *Pancreas*, 2015. **44**(3): p. 429-33.
316. Montañana-Llorens, C., *Activación del eosinófilo en la pancreatitis aguda.*, in *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular*. 2008, Universitat de València: Valencia.

317. de-Madaria, E., et al., *Update of the Atlanta Classification of severity of acute pancreatitis: should a moderate category be included?* Pancreatology, 2010. **10**(5): p. 613-9.
318. Phillip, V., J.M. Steiner, and H. Algul, *Early phase of acute pancreatitis: Assessment and management.* World J Gastrointest Pathophysiol, 2014. **5**(3): p. 158-68.
319. Vege, S.S., et al., *Initial Medical Treatment of Acute Pancreatitis: American Gastroenterological Association Institute Technical Review.* Gastroenterology, 2018. **154**(4): p. 1103-1139.
320. Halonen, K.I., et al., *Severe acute pancreatitis: prognostic factors in 270 consecutive patients.* Pancreas, 2000. **21**(3): p. 266-71.
321. Gullo, L., et al., *Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality.* Pancreas, 2002. **24**(3): p. 223-7.
322. Busquets, J., et al., *Evolution and results of the surgical management of 143 cases of severe acute pancreatitis in a referral centre.* Cir Esp, 2014. **92**(9): p. 595-603.
323. Carballo, F. and C. Martinez de Pancorbo, *Epidemiological aspects of acute pancreatitis.* Ann Ital Chir, 1995. **66**(2): p. 155-8.
324. Fernandez-Cruz, L., et al., *Acute necrotizing pancreatitis: a multicenter study.* Hepatogastroenterology, 1994. **41**(2): p. 185-9.
325. Bansal, S.S., et al., *Performance of the revised Atlanta and determinant-based classifications for severity in acute pancreatitis.* Br J Surg, 2016. **103**(4): p. 427-33.
326. Ignatavicius, P., et al., *How severe is moderately severe acute pancreatitis? Clinical validation of revised 2012 Atlanta Classification.* World J Gastroenterol, 2017. **23**(43): p. 7785-7790.
327. Acevedo-Piedra, N.G., et al., *Validation of the determinant-based classification and revision of the Atlanta classification systems for acute pancreatitis.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2014. **12**(2): p. 311-6.
328. Gloor, B., et al., *Late mortality in patients with severe acute pancreatitis.* Br J Surg, 2001. **88**(7): p. 975-9.
329. Mutinga, M., et al., *Does mortality occur early or late in acute pancreatitis?* Int J Pancreatol, 2000. **28**(2): p. 91-5.
330. Lankisch, P.G., et al., *Etiology and age have only a limited influence on the course of acute pancreatitis.* Pancreas, 1996. **13**(4): p. 344-9.
331. Cavaillon, J.M., et al., *Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review.* J Endotoxin Res, 2001. **7**(2): p. 85-93.

332. Cavaillon, J.M. and D. Annane, *Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS*. J Endotoxin Res, 2006. **12**(3): p. 151-70.
333. Heinzl, F.P., *The role of IFN-gamma in the pathology of experimental endotoxemia*. J Immunol, 1990. **145**(9): p. 2920-4.
334. Yin, K., et al., *Role of interferon-gamma in lung inflammation following cecal ligation and puncture in rats*. Shock, 1999. **12**(3): p. 215-21.
335. Meng, H., et al., *Effect of interferon-gamma on NF-kappaB and cytokine IL-18 and IL-27 in acute pancreatitis*. Bosn J Basic Med Sci, 2013. **13**(2): p. 114-8.
336. Yasuda, T., et al., *Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis*. J Surg Res, 2006. **135**(1): p. 18-26.
337. Adams, R.B., S.M. Planchon, and J.K. Roche, *IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding*. J Immunol, 1993. **150**(6): p. 2356-63.
338. Ryan, C.M., et al., *Gut macromolecular permeability in pancreatitis correlates with severity of disease in rats*. Gastroenterology, 1993. **104**(3): p. 890-5.
339. Ammori, B.J., et al., *Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality*. J Gastrointest Surg, 1999. **3**(3): p. 252-62.
340. Pietruczuk, M., et al., *Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(33): p. 5344-51.
341. Malmstrom, M.L., et al., *Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis*. Pancreas, 2012. **41**(2): p. 271-7.
342. Hirota, M., et al., *Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis*. Pancreas, 2000. **21**(2): p. 141-6.
343. Shen, Y., et al., *Immune dysregulation in patients with severe acute pancreatitis*. Inflammation, 2011. **34**(1): p. 36-42.
344. Staubli, S.M., D. Oertli, and C.A. Nebiker, *Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015. **52**(6): p. 273-83.
345. Samanta, J., et al., *Cytokine profile in prediction of acute lung injury in patients with acute pancreatitis*. Pancreatology, 2018.
346. Leser, H.G., et al., *Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis*. Gastroenterology, 1991. **101**(3): p. 782-5.
347. Ueda, T., et al., *Significant elevation of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis*. J Gastroenterol, 2006. **41**(2): p. 158-65.

348. Endo, S., et al., *Interleukin 18 levels reflect the severity of acute pancreatitis*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 2001. **110**(5-6): p. 285-91.
349. Wereszczynska-Siemiakowska, U., B. Mroczko, and A. Siemiakowski, *Serum profiles of interleukin-18 in different severity forms of human acute pancreatitis*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(9): p. 1097-102.
350. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
351. Clarke, C.J., et al., *IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1719-26.
352. Meher, S., et al., *Role of Biomarkers in Diagnosis and Prognostic Evaluation of Acute Pancreatitis*. J Biomark, 2015. **2015**: p. 519534.
353. Ni Choileain, N. and H.P. Redmond, *The immunological consequences of injury*. Surgeon, 2006. **4**(1): p. 23-31.
354. Gea-Sorli, S. and D. Closa, *In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 42.
355. Zhang, F.R., et al., *Genomewide association study of leprosy*. N Engl J Med, 2009. **361**(27): p. 2609-18.
356. Misch, E.A., et al., *Leprosy and the human genome*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(4): p. 589-620.
357. Pandey, A.K., et al., *NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000500.
358. Capela, C., et al., *Genetic Variation in Autophagy-Related Genes Influences the Risk and Phenotype of Buruli Ulcer*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(4): p. e0004671.
359. Guirado, M., et al., *Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer*. Hum Immunol, 2012. **73**(6): p. 668-72.
360. Thiebaut, R., et al., *RIP2 polymorphisms in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(4): p. 1055.
361. Zhang, G. and S. Ghosh, *Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 13-9.
362. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S81-96.
363. Mohd Suzairi, M.S., et al., *The functional -94 insertion/deletion ATTG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer*. Cancer Epidemiol, 2013. **37**(5): p. 634-8.

364. Cai, H., et al., *A functional insertion/deletion polymorphism (-94 ins/del ATTG) in the promoter region of the NFKB1 gene is related to the risk of renal cell carcinoma*. Urol Int, 2013. **91**(2): p. 206-12.
365. Chen, F., et al., *New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases*. Clin Chem, 1999. **45**(1): p. 7-17.
366. Romzova, M., et al., *NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications*. Hum Immunol, 2006. **67**(9): p. 706-13.
367. Gautam, A., et al., *Association of NFKB1 gene polymorphism (rs28362491) with levels of inflammatory biomarkers and susceptibility to diabetic nephropathy in Asian Indians*. World J Diabetes, 2017. **8**(2): p. 66-73.
368. Watanabe, T., M. Kudo, and W. Strober, *Immunopathogenesis of pancreatitis*. Mucosal Immunology, 2016. **10**: p. 283.
369. Zhao, H.F., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy attenuates experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride in rats*. Gut, 2005. **54**(12): p. 1759-67.
370. Rovin, B.H., L. Lu, and R. Saxena, *A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(2): p. 344-8.
371. Fang, F., et al., *Association between chemokine (C-C motif) ligand 2 gene -2518 A/G polymorphism and pancreatitis risk: a meta-analysis*. Pancreatology, 2015. **15**(1): p. 53-8.
372. Papachristou, G.I., et al., *Is the monocyte chemotactic protein-1 -2518 G allele a risk factor for severe acute pancreatitis?* Clin Gastroenterol Hepatol, 2005. **3**(5): p. 475-81.
373. Ben-Selma, W., et al., *Polymorphisms in the RANTES gene increase susceptibility to active tuberculosis in Tunisia*. DNA Cell Biol, 2011. **30**(10): p. 789-800.
374. Chu, S.F., et al., *Association between RANTES functional polymorphisms and tuberculosis in Hong Kong Chinese*. Genes Immun, 2007. **8**(6): p. 475-9.
375. Takada, T., et al., *Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects extent of sarcoidosis in a Japanese population*. Tissue Antigens, 2001. **58**(5): p. 293-8.
376. McDermott, D.H., et al., *Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study*. AIDS, 2000. **14**(17): p. 2671-8.
377. Liu, H., et al., *Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4581-5.
378. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.

379. Weersma, R.K., et al., *ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands*. *Am J Gastroenterol*, 2008. **103**(3): p. 621-7.
380. Baldassano, R.N., et al., *Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(8): p. 972-6.
381. Latiano, A., et al., *Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(29): p. 4643-51.
382. Wellcome Trust Case Control, C., et al., *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. *Nat Genet*, 2007. **39**(11): p. 1329-37.
383. Rahman, P., et al., *Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(4): p. 1020-5.
384. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
385. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(6): p. 652-7.
386. Di Meglio, P., et al., *The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17160.
387. Pidasheva, S., et al., *Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25038.
388. Sarin, R., X. Wu, and C. Abraham, *Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(23): p. 9560-5.
389. Hazlett, J., et al., *IL-23R rs11209026 polymorphism modulates IL-17A expression in patients with rheumatoid arthritis*. *Genes Immun*, 2012. **13**(3): p. 282-7.
390. Yu, R.Y., J. Brazaitis, and G. Gallagher, *The human IL-23 receptor rs11209026 A allele promotes the expression of a soluble IL-23R-encoding mRNA species*. *J Immunol*, 2015. **194**(3): p. 1062-8.
391. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 821-52.
392. Sutton, C.E., et al., *Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity*. *Immunity*, 2009. **31**(2): p. 331-41.

393. Zambrano-Zaragoza, J.F., et al., *Th17 cells in autoimmune and infectious diseases*. Int J Inflam, 2014. **2014**: p. 651503.
394. Patel, Dhavalkumar D. and Vijay K. Kuchroo, *Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions*. Immunity, 2015. **43**(6): p. 1040-1051.
395. Sherlock, J.P., et al., *IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-gammat+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1069-76.
396. Hueber, W., et al., *Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: Unexpected results of a randomised, double-blindplacebo- controlled trial*. Gut, 2012. **61**(12): p. 1693-1700.
397. Guglani, L. and S.A. Khader, *Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation*. Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(2): p. 120-7.
398. Kolls, J.K. and S.A. Khader, *The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(6): p. 443-8.
399. Dubin, P.J. and J.K. Kolls, *Th17 cytokines and mucosal immunity*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 160-71.
400. Klatt, N.R., N.T. Funderburg, and J.M. Brenchley, *Microbial translocation, immune activation, and HIV disease*. Trends in microbiology, 2013. **21**(1): p. 6-13.
401. Gordon, S.N., et al., *Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4+ T cell activation in HIV-infected individuals*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5169-79.
402. Klatt, N.R., et al., *Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection*. Mucosal immunology, 2012. **5**(6): p. 646-657.
403. Weaver, C.T., et al., *The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 477-512.
404. Pallikkuth, S., et al., *Maintenance of intestinal Th17 cells and reduced microbial translocation in SIV-infected rhesus macaques treated with interleukin (IL)-21*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003471.
405. Favre, D., et al., *Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000295.
406. Blaschitz, C. and M. Raffatellu, *Th17 cytokines and the gut mucosal barrier*. J Clin Immunol, 2010. **30**(2): p. 196-203.
407. Omenetti, S. and T.T. Pizarro, *The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 639.

408. Foitzik, T., *The enteral factor in pancreatic infection*. Pancreatology, 2001. **1**(3): p. 217-23.
409. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
410. Rodriguez-Nicolas, A., et al., *TH1 and TH2 Cytokine Profiles as Predictors of Severity in Acute Pancreatitis*. Pancreas, 2018. **47**(4): p. 400-405.
411. Chin, A.I., et al., *Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 190-4.
412. Gounni, A.S., et al., *IL-9 expression by human eosinophils: regulation by IL-1beta and TNF-alpha*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(3): p. 460-6.
413. Shi, Y., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 126-33.
414. Dabbagh, K. and D.B. Lewis, *Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses*. Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(3): p. 199-204.
415. Rahman, A.H., D.K. Taylor, and L.A. Turka, *The contribution of direct TLR signaling to T cell responses*. Immunol Res, 2009. **45**(1): p. 25-36.
416. Jin, B., et al., *The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 836485.
417. Plantinga, T.S., et al., *Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia*. J Infect Dis, 2012. **205**(6): p. 934-43.
418. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1071-82.
419. Skevaki, C., et al., *Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases*. Clin Exp Immunol, 2015. **180**(2): p. 165-77.
420. Piotrowski, P., et al., *Contribution of toll-like receptor 9 gene single-nucleotide polymorphism to systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 2013. **33**(5): p. 1121-5.
421. Lazarus, R., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies*. Genomics, 2003. **81**(1): p. 85-91.

ANEXO

TH1 AND TH2 CYTOKINE PROFILES AS PREDICTORS OF SEVERITY IN
ACUTE PANCREATITIS

Rodriguez Nicolas; Antonio; Martinez-Chamorro; Alba, Jiménez; Pilar, Matas-Cobos, Ana; Redondo-Cerezo, Eduardo, Ruiz-Cabello, Francisco. (2018). TH1 and TH2 Cytokine Profiles as Predictors of Severity in Acute Pancreatitis. Pancreas. 47. 1. 10.1097/MPA.0000000000001006.

ANEXO

ABSTRACT

Objectives: In up to 20% of patients, Acute Pancreatitis (AP) is severe, with high mortality and severity. The quantification of serum TH1 and TH2 cytokines could provide objective evidence for the assessment of the severity of AP and the prediction of its course.

Methods: 117 patients were included. We determined the following cytokines in serum: IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13, IL18, GM-CSF, IFN γ and TNF α .

Results: When comparing the group of patients with severe AP with those with mild or moderately severe AP, we found differences in IFN- γ (P<0.001), IL6 (P<0.001), TNF- α (P=0.002), GM-CSF (P<0.001), IL4 (P=0.002), IL1b (P=0.017), and IL13 (P<0.001). IFN- γ , IL6 and TNF- α were associated with severe AP, whereas GM-CSF, IL4, IL1b and IL13 were associated with mild or moderate condition. The group of patients who died and the survivors showed differences in IFN- γ (P<0.001), IL5 (P<0.009), IL6 (P<0.001), TNF- α (P<0.001), IL18 (P=0.017) and IL10 (P=0.017). We calculated a IL13/IFN γ ratio, that was significantly higher in patients with mild AP (p=7.36x10⁻⁸).

Conclusions: There is a TH1 profile associated with a poor prognosis and a TH2 profile associated with a mild or moderate condition. We describe an IL13/IFN γ ratio that could be of great interest in the assessment of prognosis in AP.

Keywords: Acute pancreatitis, cytokines, Atlanta 2012 classification, acute pancreatitis severity, TH1, TH2.

INTRODUCTION

Acute pancreatitis (AP) is a common digestive disease, with a reported incidence ranging 4.9-35 per 100.000 population 1. An increasing incidence has been observed in many European countries in the last decades; this fact may be attributed to the increased alcohol consumption, or to the improvement of the diagnostic techniques 2, 3. The course of the disease is usually benign, but in up to 20% of patients, the condition is severe, with a substantial increase of morbidity and mortality. Among these severe cases, 15%-20% may die due to complications associated with AP 2. A prospective and multicenter analysis showed an overall mortality rate of 5.2% (17.1% in severe acute pancreatitis and 1.2% in mild forms) 4.

Many investigators suggest that the trigger event of the AP is the destruction of pancreatic parenchyma, after the unregulated intracellular activation of digestive enzymes 5. This induces an inflammatory reaction that is amplified leading a generalized systemic inflammatory response. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS), a potentially lethal complication in severe AP 6, results in a complex inflammatory cascade that involves, among others, an excessive release of proinflammatory mediators such as some interleukins (IL1, IL6, and IL8), transforming growth factor (TGF), and tumor necrosis factor (TNF) 7. Given the substantial morbidity and mortality derived from severe AP, an early prediction of poor outcomes is of paramount importance. In 1991 Leser et al 8 observed that the elevation of IL-6 in serum was associated with severity in AP. Since then several groups have reported that circulating levels of IL6, IL8, IL1, TGF, and TNF are

higher in patients with complicated pancreatitis than they are in those with mild disease 9-11.

Different pathogenic theories have arisen trying to address the pathophysiology of AP. Many environmental factors have been recognized as precipitating, with gallstone migration and alcohol abuse being the main causes 5. However, the severity of disease doesn't seem to be directly related with the aetiology, and not all subjects with similar risk factors develop acute pancreatitis. This fact suggests a role of individual factors, such as the genetic background 12. Several studies have demonstrated the importance of genetic factors for the susceptibility and severity of AP 13, 14. The association of genetic variants involved in pancreatic autodigestion with AP susceptibility (such as PRSS1, SPINK1 or CFTR) has been widely recognized. 15-18. On the other hand, genetic variants related to the activation of immune system in response to extracellular signals and the subsequent increase of cytokine levels, have been linked to the severity of AP. Some examples of this are cytokines genes, chemokines genes 19-24 and, like our team has recently described, genes that encode Toll-like receptors (TLRs) 12. These receptors of the innate immunity recognize external and host signals [microbial associated molecular patterns (MAMPs) and danger associated molecular patterns (DAMPs)], respectively 25, 26. They are essential in the onset and maintenance of the inflammatory response, and they can contribute to the regulation of T cell cytokine-profile 25, 27, 28. Indeed, the importance of these proteins in the development of SIRS has been reported 29.

Therefore, in this study we tried to find a relationship between serum cytokine levels and the severity of AP, as well as with genetic polymorphisms in the TLRs

genes, in order to find a good prognostic marker. Then, we measured simultaneously several cytokines in serum (IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13, IL18, GMCSF, IFN γ and TNF α), in order to address their relation with the severity of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Patient population

117 patients diagnosed with AP were prospectively included (51 males and 66 females), all of them from Southern Spain. The diagnosis of AP was made upon standard criteria, requiring two of the following three features: acute abdominal pain, at least 3-fold elevated levels of serum amylase, and positive findings on abdominal ultrasonography and/or computed tomographic scan. The Ethics Committee for Clinical Research of the University Hospital "Virgen de las Nieves" (Granada, Spain) approved the protocol (May 2011) and patients provided informed written consent prior to study enrollment.

Regarding severity, the patients were assigned to groups according to the criteria established by the Atlanta 2012 classification 30: mild, moderately severe or severe AP. Other data related to the etiology or the severity of the disease, such as the number of days in intensive care unit (ICU) or the number of deaths, were also collected.

ANEXO

Samples

The patients' venous blood samples were obtained in the first 24 hours after hospital admission. Samples were centrifuged as soon as possible and the collected serum fraction was stored below -80°C until analysis. Moreover, genomic DNA was isolated from EDTA treated peripheral blood using MagAttract DNA Mini M48 Kit on the BioRobot M48 (QIAGEN, Hilden, Germany).

Cytokine measurements

A simultaneous measurement of several cytokines in serum was performed (IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13, IL18, GMCSF, IFN γ and TNF α) using a ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay (eBioscience, San Diego, CA, USA) based on the Luminex® technology, according to the manufacturer's protocol. The results were analyzed with ProcartaPlex Analyst Software 1.0 (eBioscience, San Diego, CA, USA).

SNPs genotyping

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in TLRs genes were genotyped using a Taqman® Allelic Discrimination Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in standard mode of AB 7500 Fast Real RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The SNPs included in this study have been described by our team in a previous work 12.

On the other hand, some blood determinations were measured, such as white blood cell count, plasma levels of C Reactive Protein (PCR), creatinine, calcium or amylase.

Statistical analysis

Patients were stratified according to etiology, severity, mortality and genotype of TLRs. The differences in the levels of cytokines were evaluated by non parametric tests (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis when necessary). In order to check the relation between the cytokines and the severity, we tried to correlate them with the number of days in ICU using the Kendall's tau-b correlation coefficient.

A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed for each of the 12 cytokines at day 0 for the prediction of severity. The area under the ROC curve (AUC) reflects how well the single cytokine predicts severity. Later, a multiple discriminant analysis was performed, using the Wilks' lambda test, to identify the variables which differ most between patients with mild AP and moderately severe /severe AP. A ratio calculated using the most discriminant cytokines was studied in relation to severity and mortality.

Descriptive statistics were given reporting median (Interquartile Range, IQR) and frequencies (n and %) and statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences v.17 (SPSS v17.0 Inc. Chicago, IL, USA). The p-values are not corrected and it was considered a type 1 error (α) of 0.05 to reject the hypothesis testing.

RESULTS

Patients mean age was 64.16 +/- 16.7 years. The main etiological factors of AP were gallstones (65.8%), alcohol (10.3%), post Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography (2.6%), mixed (alcohol and gallstones) (1.7%),

ANEXO

metabolic (1.7%), and drug induced (0.9%). Idiopathic pancreatitis was diagnosed in 17 cases (14.5%). Nine patients were admitted to ICU (9.4%). 7 patients (6%) died during the hospital stay. Mean length of hospital stay was 10.86 days (range 3-90 days). Mean length of ICU admission was 11.89 (range 1-32 days).

Relation of serum cytokines with the etiology of AP

At inclusion, serum levels of several cytokines were measured simultaneously (IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13, IL18, GM-CSF, IFN γ and TNF α). Regarding to the aetiology, we were not able to address a relationship between the cause of AP and the cytokine levels (data not shown).

Relation of serum cytokines and severity of AP

For the next step of statistical analysis, the patients were stratified into groups according to the severity, based on the Atlanta' 2012 criteria: mild (92 patients, 78.6%), moderately severe (17 patients, 14.6%) and severe (8 patients, 6.8%). As shown in Table 1, the levels of 7 of the measured cytokines (IFN- γ , IL6, TNF- α , GM-CSF, IL4, IL1b, and IL13) showed significant differences, when comparing the group of patients with severe AP and patients with mild or moderately severe AP. There were no differences in the levels of the other 5 cytokines between groups. Elevation of IFN- γ , IL6 and TNF- α were associated with severe AP, whereas increased levels of GM-CSF, IL4, IL1b and IL13 were associated with a mild or moderately severe condition.

On the other hand, when we compared the group of patients with severe or moderately severe AP with the group of patients with mild AP, increased levels of

IFN- γ , TNF- α , IL5, IL6, and IL10, were associated with severe AP. The levels of the other cytokines were not significantly different between groups (Table 2).

Another marker of severity is the length of in-hospital stay. In this regard, by means of the Kendall's tau-b correlation coefficient, we found that could be established a positive lineal correlation between the serum levels of some cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL10, and IL18) and the length of stay (Table 3). We also found a positive lineal correlation between the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL10, and IL6 and the length of ICU stay (Table 3).

Finally, we found an association between the cytokine levels and mortality. Specifically, serum levels of IFN- γ , IL5, IL6, TNF- α , IL18 and IL10 were significantly higher in the group of patients who died. Therefore, based on our data, there is an association between high levels of IFN- γ , TNF- α , IL5, IL6 and IL10 with death (Table 4).

Relation of serum cytokines and other parameters

Calcium, creatinine, CPR and amylase are classical biochemical markers of AP. We studied the relation of these markers (in the onset of the disease and after 48 hours) with the severity. When comparing mild with severe or moderately severe AP by logistic regression we found a correlation between CPR levels and severity ($P = 0.008$). We also studied the relation of these markers with the cytokine levels. Our data shows that IFN- γ is positively correlated with creatinine ($P < 0.001$) and CPR ($P = 0.04$), and negatively correlated with calcium ($P = 0.03$). TNF- α levels are positively correlated with creatinine ($P = 0.008$) and CPR ($P = 0.06$), and negatively

ANEXO

correlated with calcium ($P=0.05$). IL1b is positively correlated with calcium levels ($P=0.02$)

Eosinophil count was measured at admission and after 48 hours in order to elucidate whether it there was correlated with serum IL5. We were not able to address a relationship (data not shown).

ROC analysis and IL13/IFN γ ratio

ROC curves of IL6, IFN- γ and TNF- α showed that they can be measured for the prediction of severe or moderately severe acute pancreatitis (Table 5). A mild condition can be predicted with the ROC curves of IL4, L13, GM-CSF (Table 6). A further stepwise analysis showed that IL13 and IFN- γ were the biomarkers which contributed most to the discrimination between mild AP and moderately severe /severe AP (Wilks' lambda = 0.855, $p<0.0001$; Wilks' lambda = 0.747, $p<0.0001$, respectively). So, we selected both cytokines and calculated the IL13/IFN γ ratio in order to demonstrate the prognostic power of this index The IL13/IFN γ ratio was significantly higher in patients with mild AP when we compared between groups ($p=7.36\times 10^{-8}$). This difference was also observed between severe AP and the rest of patients ($p=0.007$) and both results were more remarkable than if we only considered the IL13 measurement. Moreover, the ROC curve was also modified, increasing the area under the curve (AUC), sensibility and specificity (as shown in Figure 1 and Table 6), in relation to AP severity. Therefore, we can affirm that a high value of the IL13/IFN γ ratio at the moment of hospital admission is associated with a good prognosis of AP.

TLRs and serum cytokines in AP

Patients were stratified according to the genotype of TLRs, in order to address the relation of these polymorphisms with cytokine levels. In this issue, the patients carrying the TLR1 rs5743611-C allele had increased levels of IL2p70 ($p=0.010$) compared to those carrying the GG genotype. We also found an association between TLR6 rs5743795 and cytokine levels; the patients with the wildtype genotype (GG) showed higher levels of IL1b ($p=0.008$) and IL4 ($p=0.025$). Previously, our team found an association between TLR6 rs5743795 and AP severity: the GG genotype was related to a lower risk of severe AP (these results can be checked in 12). Levels of IFN- γ were increased in patients carrying the mutant allele TLR9 rs352140-C, while, in contrast, GMC-SF were decreased.

DISCUSSION

In order to address if there is a relationship between increased levels of different cytokines in serum and the severity of the disease, we performed extensive profiling of serum cytokines in 177 subjects diagnosed with acute pancreatitis upon admission to the hospital.

Interestingly, when we tried to address the relation between serum cytokines with the severity of the disease, we found that we could distinguish two different serum profiles: a TH1 profile composed mostly by proinflammatory cytokines, and a second TH2 profile composed by anti-inflammatory cytokines.

ANEXO

The TH1 profile is associated with a worst prognosis. When we stratified our patients according to Atlanta'2012 criteria, we observed that serum concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL5, IL6, and IL10 were significantly elevated in patients with severe AP compared with those with moderately severe or mild pancreatitis. High levels of IFN- γ , TNF- α , and IL6 were also associated with severity when comparing severe and moderately severe AP vs. those with mild pancreatitis. We included the length of stay in the hospital and the need of intensive care as other markers of severity. We were able to establish a positive lineal correlation between the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL10, IL18 and the length of hospital stay. We also found a positive lineal correlation between the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL10, and IL6 and the length of ICU stay. Finally, we included the mortality as another marker of severity. We found that the levels of some cytokines (IFN- γ , IL5, IL6, TNF- α , IL18 and IL10) were significantly higher in the group of patients who died.

The aforementioned data support the thesis of a harmful role of the proinflammatory cytokines IFN γ , TNF α , IL6 and IL18 in the course of AP. This detrimental role of proinflammatory cytokines in AP has been previously described 9, 10, 31.

Our data shows that, addition to proinflammatory mediators, the IL10 and IL5 are also elevated in the cohort of patients that developed a poor or fatal outcome. Although IL10 is highly regarded as an anti-inflammatory cytokine, it has been suggested that IL10 may have a pleiotropic role, with anti-inflammatory and proinflammatory effects, that include reduction of MHC class II antigen expression, increased B-cell survival time and blockade of the NF- κ B JAK-STAT pathway 7. It

appears that IL10 promotes local effectors mechanisms, such as activation of Natural Killer cells and stimulating the expression of cytotoxic molecules 32. The elevation of IL10 plasma concentration has been shown to be elevated in the very early phase of AP and to predict development of organ failure 10, 33. IL10 has also be shown to be raised along pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL6, IL8) 34. Our results support the harmful role of IL10 in AP.

IL5 is an interleukin produced by type-2 T helper cells and mast cells. It is the main cytokine promoting the differentiation of eosinophil progenitors, and enhances the effector capacity of mature eosinophils 35.

Although considerable research has been previously devoted to the study of pro-inflammatory cytokines, less attention has been paid to the anti-inflammatory mediators on the onset of the disease. Interestingly, we could identify a second anti-inflammatory mediator profile in the onset of acute pancreatitis. When comparing the group of patients with severe acute pancreatitis with the groups of patients with mild or moderately severe AP, increased levels of GM-CSF, IL4, IL1b, IL13 were associated with a mild or moderately severe condition.

It has been established that the SIRS response is finally followed by a phase of suppressed inflammatory response, known as compensatory response syndrome (CARS), that manifests as a severe acute pancreatitis associated with organ failure. In this phase, the immune system is downregulated, leading to higher susceptibility to infections. This is an important cause of late morbidity and mortality in AP 36, 37. Nevertheless, the CARS is engaged several days after the onset. In addition, the cohort of patients with increased levels of GM-CSF, IL4, IL1b,

and IL13 had a better clinical outcome. In this work, we describe for the first time a TH2 cytokine profile in the onset of acute pancreatitis, associated with a better prognosis. It could be hypothesized that these patients engage an early anti-inflammatory compensatory response to SIRS that has beneficial effects in the long term. Moreover, we calculated a IL13/IFN γ ratio, and we demonstrated that a high value was significantly associated with a good prognosis of AP. The ROC curve showed that this ratio has a higher area under the curve (AUC), sensibility and specificity. This IL13/IFN γ ratio could be an excellent tool for clinicians in order to be able to predict the clinical outcome of their patients.

The differences observed in the cytokine profile among our patients, that it's related with the severity, may be due to individual factors. We found that the cytokine levels are not correlated to the underlying aetiology and that the cause of AP have little or no impact in AP mortality, as other authors have previously published 38-40. One hypothesis could be that the cytokine profile, and therefore also the severity of AP, was directly related to the different responses of each individual through innate immunity receptors to some molecular signals, due to environmental factors or to genetic background. For this reason, we have included the study of TLRs in our work, because it has been demonstrated that their signaling pathways may contribute to a different cytokine profile (TH1 or TH2 and to IFN liberation) in response to the MAMPs and DAMPs repertoire 27, 41, 42, and their signaling can be altered by the presence of genetic polymorphism 43. Therefore, in the present study, we have included the results obtained in a previous work performed by our team 12, and we have found some evidences that suggest a relation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLRs genes

and the cytokines profile. The genotype TLR6 rs5743795-GG was significantly associated with lower levels of IL1 β and IL4 in the AP patients, and both cytokines have been related with a mild AP in our population. According to that, the patients carrying the wild type GG genotype are more likely to develop a milder form of AP, such as we have demonstrated previously 12. Consequently, these recent findings confirm the protector role of TLR6 against a severe AP, and suggest that it might be related to the signaling pathways and the release of cytokines. This polymorphism is located in an intronic region 28 and it is difficult to determine how the functionality of the protein could be affected since there are not many studies about this 43.

Furthermore, the levels of IL12p70 were significantly higher in patients carrying the mutant allele TLR1 rs5743611-C. This SNPs encodes an amino acid change (R80T) and it has been related with an impaired signaling and an altered gene transcription, such as those that encode proinflammatory cytokines 44. TLR9 has also been linked to the cytokine profile in AP: the level of IFN- γ was higher and the level of GM-CSF was lower in patients carrying the allele TLR9 rs352140-T than in those carrying the wild type genotype. Since this polymorphism encodes a silent mutation (P545P), the influence observed in the cytokine profile may be due to the linkage disequilibrium with other polymorphisms 45, 46.

In conclusion, for the first time we have been able to identify a TH1 and a TH2 profile in the onset of AP. In addition to a TH1 proinflammatory cytokine profile composed by (IFN- γ , TNF- α , IL5, IL6, IL10 and IL18), we describe a TH2 anti-inflammatory cytokine profile associated with a better prognosis. We also describe

ANEXO

a novel IL13/IFN γ ratio with high sensibility and specificity in the assessment of prognosis in AP.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs Eva Garcia for her technical support in the laboratory procedures. This study is part of the doctoral thesis of Antonio Rodriguez-Nicolas.

This work was supported by grants co-financed by FEDER funds (EU) from the Instituto de Salud Carlos III (PI11/01386) and Junta de Andalucía in Spain (Group CTS-143).

REFERENCES

1. Vege SS, Yadav D, Chari ST. Pancreatitis. *Gi Epidemiology*. 2007;221-225.
2. Banks PA. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endoscopy*. Dec 2002;56(6 Suppl):S226-230.
3. Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, et al. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. Feb 2002;17 Suppl:S15-39.
4. Cavallini G, Frulloni L, Bassi C, et al. Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. Mar 2004;36(3):205-211.
5. Frossard J-L, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *The Lancet*. 2008;371(9607):143-152.
6. Vaz J, Akbarshahi H, Andersson R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. Feb 07 2013;19(5):616-630.
7. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*. 2010;2(3):161-175.
8. Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology*. Sep 1991;101(3):782-785.
9. Nieminen A, Maksimow M, Mentula P, et al. Circulating cytokines in predicting development of severe acute pancreatitis. *Critical care*. 2014;18(3):R104.
10. Gunjaca I, Zunic J, Gunjaca M, et al. Circulating cytokine levels in acute pancreatitis-model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity. *Inflammation*. Apr 2012;35(2):758-763.
11. Chen CC, Wang SS, Lee FY, et al. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. Jan 1999;94(1):213-218.
12. Matas-Cobos AM, Redondo-Cerezo E, Alegria-Motte C, et al. The role of Toll-like receptor polymorphisms in acute pancreatitis occurrence and severity. *Pancreas*. Apr 2015;44(3):429-433.
13. Mounzer R, Whitcomb DC. Genetics of acute and chronic pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology*. Sep 2013;29(5):544-551.
14. LaRusch J, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology*. Sep 2011;27(5):467-474.

15. Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*. Jun 2000;25(2):213-216.
16. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature genetics*. Oct 1996;14(2):141-145.
17. Pfutzer R, Myers E, Applebaum-Shapiro S, et al. Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. Feb 2002;50(2):271-272.
18. Koziel D, Gluszek S, Kowalik A, et al. Genetic mutations in SPINK1, CFTR, CTRC genes in acute pancreatitis. *BMC gastroenterology*. Jun 23 2015;15:70.
19. Zhang DL, Li JS, Jiang ZW, et al. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute biliary pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. Apr 2003;9(4):824-828.
20. Balog A, Gyulai Z, Boros LG, et al. Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas*. Mar 2005;30(2):e46-50.
21. Papachristou GI, Sass DA, Avula H, et al. Is the monocyte chemotactic protein-1 -2518 G allele a risk factor for severe acute pancreatitis? *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. May 2005;3(5):475-481.
22. Bishehsari F, Sharma A, Stello K, et al. TNF-alpha gene (TNFA) variants increase risk for multi-organ dysfunction syndrome (MODS) in acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. Mar-Apr 2012;12(2):113-118.
23. Yin YW, Hu AM, Sun QQ, et al. Association between tumor necrosis factor-alpha gene -308A/G polymorphism and the risk of acute pancreatitis: a meta-analysis. *The Journal of surgical research*. Nov 2012;178(1):409-414.
24. Bao XB, Ma Z, Gu JB, et al. IL-8 -251T/A polymorphism is associated with susceptibility to acute pancreatitis. *Genetics and molecular research : GMR*. Feb 20 2015;14(1):1508-1514.
25. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-376.
26. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*. Jul 2004;4(7):499-511.
27. Rahman AH, Taylor DK, Turka LA. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunologic research*. 2009;45(1):25-36.
28. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. Sep 21 2007;130(6):1071-1082.

29. Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Cutting Edge: An Endogenous Pathway to Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Like Reactions through Toll-Like Receptor 4. *The Journal of Immunology*. 2003;172(1):20-24.
30. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. Jan 2013;62(1):102-111.
31. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *American journal of surgery*. Jan 1998;175(1):76-83.
32. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, et al. The dual role of IL-10. *Trends in immunology*. Jan 2003;24(1):36-43.
33. Kylanpaa L, Rakonczay Z, Jr., O'Reilly DA. The clinical course of acute pancreatitis and the inflammatory mediators that drive it. *International journal of inflammation*. 2012;2012:360685.
34. Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A, et al. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine*. Aug 21 2001;15(4):232-236.
35. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *The Journal of experimental medicine*. Feb 1 1994;179(2):703-708.
36. Meher S, Mishra TS, Sasmal PK, et al. Role of Biomarkers in Diagnosis and Prognostic Evaluation of Acute Pancreatitis. *Journal of biomarkers*. 2015;2015:519534.
37. Ni Choileain N, Redmond HP. The immunological consequences of injury. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. Feb 2006;4(1):23-31.
38. Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, et al. The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas*. Nov 2006;33(4):336-344.
39. Gullo L, Migliori M, Olah A, et al. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas*. Apr 2002;24(3):223-227.
40. Lankisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M, et al. Etiology and age have only a limited influence on the course of acute pancreatitis. *Pancreas*. Nov 1996;13(4):344-349.
41. Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Current opinion in infectious diseases*. Jun 2003;16(3):199-204.
42. Jin B, Sun T, Yu XH, et al. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:836485.
43. Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K, et al. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clinical and experimental immunology*. May 2015;180(2):165-177.

ANEXO

44. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *The Journal of infectious diseases*. Mar 15 2012;205(6):934-943.
45. Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, et al. Contribution of toll-like receptor 9 gene single-nucleotide polymorphism to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*. May 2013;33(5):1121-1125.
46. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*. 2003;81(1):85-91.

Tables:

Table 1. Comparison of cytokine levels between patients with severe pancreatitis and with. mild/moderate pancreatitis

	Severe AP (N=8)		Mild and moderate AP (N=109)		P-value
	Median	IQR	Median	IQR	
IL1b	2.03	4.15	6.05	6.07	n.s
IL2	0	7.84	0	6.34	n.s
IL4	3.67	6.84	5.64	6.07	n.s
IL5	0.64	2.89	0	0	0.025
IL6	571.55	1667.19	0	43.37	<0.001
IL10	8.24	43.89	0.86	2.14	n.s
IL12p70	0.00	2.35	2.03	2.16	n.s
IL13	1.05	4.59	4.52	4.57	n.s
IL18	140.20	162.73	63.11	68.46	n.s
IFN γ	13.42	20.44	2.10	4.40	<0.001
TNF α	4.36	7.25	0	1.48	n.s
GMCSF	0	0	17.16	17.54	<0.001

P-value was considered significant only when it was smaller than 0.05

AP=Acute Pancreatitis; IQR=Interquartile Range; n.s.=not significant

ANEXO

Table 2. Comparison of cytokine levels between patients with mild pancreatitis and with. Moderate/severe pancreatitis

	Mild AP (N=92)		Severe and moderate AP (N=25)		P-value
	Median	IQR	Median	IQR	
IL1b	6.09	6.04	1.71	2.52	0.017
IL2	0	13.49	0	6.68	n.s
IL4	5.69	0.80	0	5.95	0.002
IL5	0	0	0	0	n.s
IL6	0	34.60	195.32	483.21	<0.001
IL10	0.84	1.98	1.37	6.69	n.s
IL12p70	2.03	2.11	0	2.72	n.s
IL13	4.52	0.14	0	2.37	<0.001
IL18	53.77	76.15	84.85	78.71	n.s
IFN γ	1.67	2.30	10.35	8.77	<0.001
TNF α	0	1.38	1.02	3.72	0.002
GMCSF	17.16	17.54	0	0	<0.001

P-value was considered significant only when it was smaller than 0.05

AP=Acute Pancreatitis; IQR=Interquartile Range; n.s.=not significant

Table 3. Lineal correlation between serum cytokine levels and the length of hospital and ICU stay

	Kendall's tau B correlation coefficient (τ)	
	Length of hospital stay	Length of ICU stay
IFNg	0,237*	0,279*
TNF α	0,276*	0,209*
GMCSF	-0,167	-0,140
IL1b	-0,034	-0,039
IL2	0,066	-0,002
IL4	-0,038	-0,025
IL5	0,081	0,165
IL6	0,302*	0,272*
IL10	0,185*	0,200*
IL12p70	-0,031	-0,032
IL13	-0,098	-0,070
IL18	0,171*	0,138

*A significant lineal correlation was found.

Table 4. Relation between serum cytokine levels and mortality in patients with AP

	Dead		Survivors		
	Median	IQR	Median	IQR	
IL1 β	2.35	5.21	6.05	1.09	n.s
IL2	0	6.68	0	0	n.s
IL4	3.67	7.17	5.61	0	n.s
IL5	1.27	6.09	0	0	0.009
IL6	643	1043.33	0	195.32	<0.001
IL12p70	0	3.13	2.03	2.68	n.s
IL13	2.10	5.33	4.52	0.00	n.s
IL10	7.34	55.99	0.89	2.77	0.017
IL18	167.2	64.49	62.20	146.05	0.017
IFN- γ	21.0	7.17	2.11	22.24	<0.001
TNF- α	4.85	3.92	0	1.48	<0.001
GMCSF	0	0	17.2	0	n.s

P-value was considered significant only when it was smaller than 0.05

AP=Acute Pancreatitis; IQR=Interquartile Range; n.s.=not significant

Table 5. Receiver operating characteristic (ROC) curves of cytokines for prediction of moderate/severe acute pancreatitis

Predictive cytokine and cutoff value	AUC	Sensibility (%)	Specificity (%)
IL6 (>52.30 pg/mL)	0.80	72	83
IFN- γ (>4.47 pg/mL)	0.91	88	81.5
TNF- α (>0.49 pg/mL)	0.69	72	70

AUC=Area under the curve

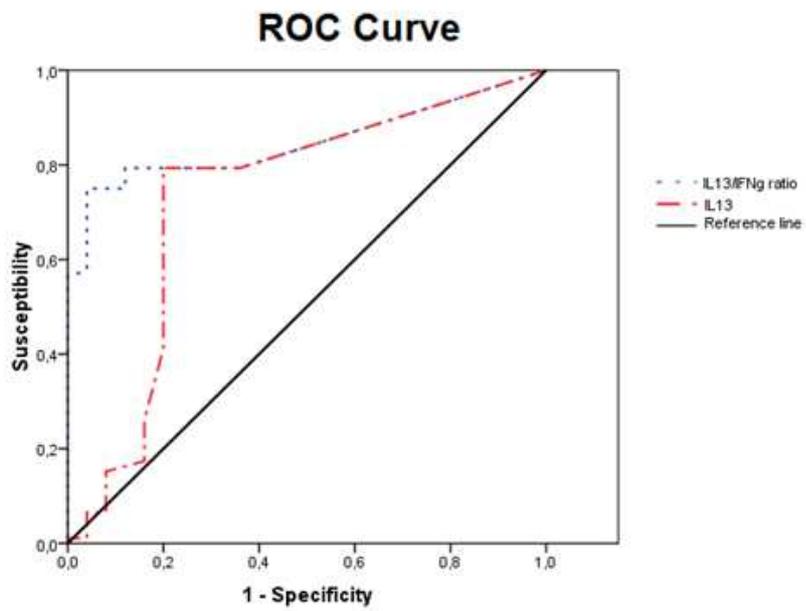
Table 6. Receiver operating characteristic (ROC) curves of cytokines for prediction of mild acute pancreatitis

Predictive cytokine and cutoff value	AUC	Sensibility (%)	Specificity (%)
IL4 (>4.50 pg/mL)	0.70	78	72
IL13 (>3.42 pg/mL)	0.73	79	80
GM-CSF (>8.58 pg/mL)	0.74	62	88
Ratio IL13/IFN- γ (>1.08)	0.85	75	96

AUC=Area under the curve

Figures:

Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve performed for IL13 (dots) and for IL13/IFN γ ratio (dots and stripes).



ASSOCIATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS OF INFLAMMATORY
RESPONSE GENES AND ACUTE PANCREATITIS

Rodriguez Nicolas; Antonio; Jiménez, Pilar; Carmona, F. David; Martín, Javier; Matas-Cobos, Ana; Ruiz-Cabello, Francisco; Redondo-Cerezo, Eduardo. (2019). Association between Genetic Polymorphisms of Inflammatory Response Genes and Acute Pancreatitis Immunological Investigations, 48:6, 585-596, DOI:[10.1080/08820139.2019.1576729](https://doi.org/10.1080/08820139.2019.1576729)

ABSTRACT

Inflammation plays a central role in the pathophysiology of acute pancreatitis (AP). We hypothesized that changes in the function of key components of the inflammatory cascade, caused by genetic polymorphisms, could determine the development and/or severity of AP.

We studied the following polymorphisms in 269 patients: *IL23R* rs11209026, *TNF* rs1800629, *RIPK2* rs42490, *NOD2* rs9302752, *MCP1* rs1024611 and *NFKB1* rs28362491.

The rs11209026 A allele was related to the presence of AP ($P = 0.007261$; OR = 1.523). Epistasis analysis revealed that AP susceptibility was increased by interaction between *IL23R* rs11209026 and *TNF* rs1800629 ($P = 1.205e-05$; OR_{interaction} = 4.031). The rs42490-G allele was associated with an increased risk of severe pancreatitis ($P = 0.01583$; OR 2.736), severe or moderately severe pancreatitis ($P = 0.04206$; OR 1.609), and death ($P = 0.03226$; OR 3.010).

In conclusion, these results point to a plausible role for genetic polymorphisms in *IL23R* and *RIPK2* in the development and severity of AP.

Keywords

Acute Pancreatitis, Inflammation, Genetic polymorphisms, Acute Pancreatitis severity.

1. INTRODUCTION

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory condition of the pancreas with a variable involvement of other regional tissues or remote organ systems (Bradley 1993). It is a common digestive disease with a reported incidence ranging from 4.9 to 35 per 100,000 population (Vege et al. 2007). Its rising incidence in many European countries over recent decades may be related to increased alcohol consumption and/or improvements in diagnostic techniques (Banks 2002, Toouli et al. 2002). The disease is benign in 80% of patients and resolved without serious complications, but it is associated with substantial morbidity and mortality in around 20 %. Among patients with severe AP, 15% - 20% die from associated complications (Banks 2002), and a prospective multicenter study (Cavallini et al, 2004) described an overall mortality rate of 5.2% (17.1% in severe AP and 1.2% in milder forms). Despite improvements in diagnosis and management over the past few decades, the mortality rate has not diminished (Frey et al. 2006, Frossard et al. 2008, Yadav and Lowenfels 2006), making the early prediction of a poor prognosis highly important.

Various pathogenic theories have been developed on the pathophysiology of AP. Numerous environmental and genetic factors have been recognized as precipitating factors, including the presence of gallstones, heavy alcohol consumption, and overeating. However, not all subjects with risk factors develop AP, suggesting that the particular characteristics of individuals, including genetic variations, may play a role (Matas-Cobos et al. 2015).

AP is characterized by a sequence of events that begins with the unregulated intracellular activation of stored zymogens within the acinar cell (Frossard et al. 2008). This leads to acinar cell death and subsequent inflammatory reaction, whose amplification initiates a generalized systemic response. Systemic inflammatory response syndrome, a potentially lethal complication in severe AP, triggers a complex inflammatory cascade that generates an excessive release of proinflammatory mediators, including interleukin (IL)1, IL6, IL8, transforming growth factor (TGF), and tumor necrosis factor (TNF), among others (Jaffer et al. 2010)

Various groups of genetic mutations may participate in the pathogenesis of pancreatitis, and AP susceptibility has been widely associated with genetic variants in protease serine 1, protease serine 2, serine peptidase inhibitor Kazal type 1, and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes (Koziel et al. 2015, Pfutzer et al. 2002, Whitcomb et al. 1996, Witt et al. 2000). The severity of AP has been linked to mutations related to immune system activation in response to extracellular signals and a consequent increase in cytokine concentrations, including genes encoding cytokines, chemokines (Balog et al. 2005, Bao et al. 2015, Bishehsari et al. 2012, Papachristou et al. 2005, Zhang et al. 2003), and Toll-like receptors (TLRs), as reported by our group (Matas-Cobos et al. 2015).

With this background, the objective of our study was to explore the relationship between AP severity and variations in genes related to the inflammatory process, with the aim of identifying a useful prognostic marker. The investigated SNPs have previously been shown to alter the inflammatory response (Di Meglio et al. 2011, Fang et al. 2015, Karban et al. 2004, Wilson et al. 1997, Zhang et al. 2009).

2. METHODS

2.1 Patient population

The study included 269 patients diagnosed with AP, all from Southern Spain, with a mean age of 64.58 years; 52.8% were female (see table 1). Written informed consent was obtained from all patients, and the local ethics committee approved the study (May 2011). Exclusion criteria were age under 18 years and refusal of informed consent to participate in the study.

AP was diagnosed when at least two of the following three criteria were met: abdominal pain, serum amylase levels at least three-fold higher than the upper normal limit, and positive findings on abdominal ultrasonography and/or computed tomography (CT) scan. Patients were classified with mild, moderately severe, or severe AP according to the criteria established by the 2012 Atlanta consensus (Banks et al. 2013). A blood sample was drawn for polymorphism determination within 24 h of hospital admission, followed by a second blood sample at 48 h post-admission for the usual hematological and biochemical determinations. During the first 48 h, all patients were examined by abdominal ultrasonography and those with severe pancreatitis by CT. Patients were followed until hospital discharge or death, gathering data on blood analyses, clinical outcomes, and severity scales. All patients were Caucasians from the Granada area.

A control group of 1517 healthy individuals were used for the study of interleukin-23 receptor (*IL23R*) *rs11209026*, tumor necrosis factor (*TNF*) *rs1800629*, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (*RIPK2*) *rs42490*, nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (*NOD2*) *rs9302752* and monocyte

chemoattractant protein-1 (*MCP1*) *rs1024611*. These individuals had served as controls in a previous study (Mayes et al. 2014). An additional group of 390 additional healthy volunteer blood donors from the Granada area was used as controls for the study of nuclear factor kappa B subunit 1 (*NFKB1*) *rs28362491*, also known as the -94 ATTG insertion/deletion *NFKB1* promoter polymorphism. Written consent was obtained from all participants.

2.2. DNA extraction and genotyping of IL23R rs11209026, TNF rs1800629, RIPK2 rs42490, NOD2 rs9302752, and MCP1 rs1024611

Total genomic DNA was isolated from the peripheral blood of the patients with AP using the QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Polymorphisms were genotyped by means of predesigned TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). The Assays-on-Demand SNP genotyping kit (Applied Biosystems) was used for the polymerase-chain reaction (PCR). The 7500 PCR-REAL TIME Sequence Detection System was employed to measure allelic-specific fluorescence for automatic attribution of the genotype of each sample, using SDS 2.2.1 software for allelic discrimination (Applied Biosystems). SNP amplification assays were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10 ng of sample DNA (1 µl) were placed in 4 µl of the following reaction solution: 2.5 µl of the 2 x TaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems); 0.25 µl of predeveloped assay reagent from the SNP genotyping product (20x) (Applied Biosystems), containing two primers and two MGB-Taqman probes; and 1.25 µl of distilled water. PCR conditions were: preincubation at 50 °C for 2 min and at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min. The single nucleotide

polymorphisms (SNPs) detected were *IL23R rs11209026*, *TNF rs1800629*, *RIPK2 rs42490*, *NOD2 rs9302752*, and *MCP1 rs1024611*.

2.3. Genotyping of NFKB1 rs28362491

DNA was isolated as described above, using a PCR-based method to determine the -94ins/delATTG genotype. Briefly, a 289-bp PCR fragment was amplified from genomic DNA using the forward primer 5'-TTTAATCTGTGAAGAGATGTGAATG-3' and the reverse primer 5'-CTCTGGCTTCCTAGCAGG G-3'. The forward primer was 5' labeled with FAM fluorescent dye. The presence or absence of the 4-bp deletion was determined by the size of the labeled PCR product on an ABI 3100 sequencer, using the GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems).

2.4 Statistical analysis

SPSS 23.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and PLINK software (version 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) were used for statistical analyses (Purcell et al. 2007). Statistical tests for alleles, genotypes, and the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests used PLINK software (Purcell et al. 2007). For HWE testing, the significance threshold was established at 0.05. The effects of gene-gene interactions on AP susceptibility were examined using the “- -epistasis” and “- -fast-epistasis” options of PLINK. The - -epistasis option performs logistic regression analysis for interactions in which the dependent case/control grouping is expressed as a function of two polymorphisms and their interaction term according to allelic genetic models. The - -fast-epistasis option calculates the odds ratio (OR) and standard error for the interaction between two polymorphisms

separately in cases and controls, and the test for epistasis is based on a standard score (Z score) for differences in OR between cases and controls.

3. RESULTS

3.1 Distribution of tested polymorphisms in patients with AP and healthy controls.

The frequencies of all genotypes were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium. We explored the relationship of the described polymorphisms with the presence of AP, finding significant differences in the distribution of alleles and genotypes of *IL23R rs11209026* between patients and controls (Tables 2 and 3). Specifically, the -A allele strongly increased the risk of AP (OR=1.523, 95% CI 1.118 – 2,075, $P = 0.007261$). Comparison of the genotype frequencies for each SNP between AP patients and controls yielded a statistically significant difference in *IL23R rs11209026* ($P=0.006433$).

3.2. Polymorphisms association with acute pancreatitis severity.

Among the 38 patients diagnosed with moderately severe or severe AP, 8 died in hospital (21.1% of severe cases and 3% of the total population). As shown in Table 4, patients carrying the *RIPK2 rs42490*-G allele had a higher risk of severe pancreatitis (OR 2.736; 95% CI, 1.167-6.413; $P = 0.01583$) (Table 4) and of severe or moderately severe pancreatitis (OR 1.609; 95% CI, 1.013-2.557; $P = 0.04206$) in comparison to A allele carriers, and they also had a greater risk of death (OR 3.010; 95% CI, 1.043-8.684; $P = 0.03226$).

3.3 Epistatic interaction effects on AP susceptibility

We evaluated possible epistatic interactions between each pair of the SNPs (*IL23R* rs11209026, *TNF* rs1800629, *RIPK2* rs42490, *NOD2* rs9302752, and *MCP1* rs1024611) in subjects whose genotyping revealed both SNPs. As shown in Table 5, the interaction between *IL23R* rs11209026 and *TNF* rs1800629 significantly increased AP susceptibility ($P = 1.205 \times 10^{-5}$, $OR_{\text{interaction}} = 4.031$).

3.4 Association of polymorphisms with AP etiology

Gallstone migration, among many other factors, has been found to precipitate AP (Frossard, et al., 2008). However, we found no difference in the frequency of genetic polymorphisms between patients with biliary AP and controls or those with AP of any other etiology. Only 40 patients in our series had idiopathic AP, and no difference was observed in the frequency of polymorphisms between these patients and controls or patients with AP of known etiology.

4. DISCUSSION

This study explored the relationship of polymorphisms in genes related to the inflammatory process with AP presence and severity.

NOD2, and *RIPK2* polymorphisms were implicated in a multibacillary form of leprosy in a Genomewide association study (Zhang et al. 2009), and both *NOD2* and *RIPK2* play a critical role in type I interferon responses (Pandey et al. 2009). Ligand binding to *NOD2* initiates signal transduction, which is mediated by *RIPK2*

through an ubiquitination process that involves the recruitment of TAK1. *RIPK2* polymorphisms have been correlated with chronic inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease (Thiebaut et al. 2011). However, no significant association was found between polymorphisms in *NOD2* or *RIPK2* and the presence of AP in the present study. On the other hand, the *RIPK2* *rs42490*-G allele was associated with the presence of severe or moderately severe AP and with an increased risk of death, which may be attributable to stronger type I interferon responses in carriers of the *rs42490*-G allele. A previous study by our team identified two distinct profiles in AP: a TH2 profile composed of anti-inflammatory cytokines; and a TH1 profile largely composed of proinflammatory cytokines, associated with a worse prognosis (Rodriguez-Nicolas et al. 2018).

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) is a major transcription regulator of genes related to immune response, apoptosis, and cell-growth control. It plays an important role in the activation of cells displaying innate or adaptive immune receptors after the recognition of pathogens. The signal generated by the liganded receptor produces changes in gene expression, enhancing the expression of effector molecules such as cytokines (e.g., IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , LT α , LT β , and GM-CSF), chemokines (e.g., IL-8, MIP-1 α , MCP-1, RANTES, and eotaxin), and adhesion molecules (e.g., ICAM, VCAM, and E-selectin) (Ghosh and Karin 2002, Zhang and Ghosh 2001). Given its central role in inflammation, we studied a functional polymorphism in the promoter region of *NFKB1*, *rs28362491*, also known as the -94 ATTG insertion/deletion polymorphism. The -94 ATTG deletion allele have been correlated with less promoter activity (Karban et al. 2004). Our data appear to rule out a role for this polymorphism in AP susceptibility or severity.

MCP-1 has been related to the macrophage-dependent inflammatory response that characterizes pancreatitis (Watanabe et al. 2016, Zhao et al. 2005), and it has been observed that the *MCP1 rs1024611*-G allele can increase AP susceptibility or severity by elevating serum MCP-1 levels (Fang et al. 2015, Papachristou et al. 2005). However, these findings were not replicated in the present study.

Our results show that the *IL23R rs11209026* -A allele strongly increases the risk of AP development. This allele appears to provide a protective effect against various chronic inflammatory diseases and autoimmune diseases, including Crohn's disease (Baldassano et al. 2007, Duerr et al. 2006, Li et al. 2010, Weersma et al. 2008), ulcerative colitis (Latiano et al. 2008, Weersma et al. 2008), and ankylosing spondylitis (Rahman et al. 2008, Wellcome Trust Case Control et al. 2007).

Activation of T cells in the presence of IL-23 leads to expansion of the subset of TH17 cells, producers of IL-17 (Aggarwal et al. 2003, Bettelli et al. 2007). Functional characterization of the *IL23R rs11209026* SNP revealed that carriers of the protective A allele have an impaired IL-23-induced Th17 response, generating significantly less IL-17A and IL-22 in response to IL-23 and impairing IL-23 signaling at the level of pSTAT3 (Di Meglio et al. 2011, Pidasheva et al. 2011, Sarin et al. 2011). An RNA splicing study demonstrated that *rs11209026* allele A disrupts a SF2 binding site, elevating the expression of *IL23RA9*, a particular splice form that encodes a soluble form of the receptor, which is secreted from the cell and has the ability to interfere with IL-23 signaling (Yu, et al., 2015).

Th17 cells are associated with autoimmune diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and psoriasis (Sutton et al. 2009, Weaver et al. 2007,

Zambrano-Zaragoza et al. 2014). There is compelling evidence that these cells play a critical role in host defense at mucosal sites, mediating host mucosal immunity against pulmonary pathogens and protecting against extracellular bacterial infections in the gut mucosa (Dubin and Kolls 2008, Guglani and Khader 2010, Kolls and Khader 2010, Liu et al. 2017). Studies of the human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus observed that depletion of TH17 cell populations in the intestine was correlated with mucosal immune dysfunction, microbial translocation, and disease progression (Favre et al. 2009, Pallikkuth et al. 2013). It has also been suggested that TH17 cells promote gut mucosa recovery and prevent microbial translocation (Blaschitz and Raffatellu 2010, Omenetti and Pizarro 2015), and the translocation of microbial organisms has been implicated in the pathogenesis of AP (Watanabe et al. 2016). It has been reported that sustained pancreatic inflammation depends on cytokines that induce changes in bowel wall permeability, leading to the release of commensal microorganisms into the circulation and inducing innate immune responses and pro-inflammatory cytokine secretion (Foitzik 2001, Watanabe et al. 2016).

Our finding of an association between the *IL23R rs11209026* -A allele and an increased risk of AP may be explained by a greater susceptibility to infectious agents at mucosal sites due to impaired TH17 responses, which could promote translocation of microbial organisms into the gut mucosa. Together with the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) after acinar injury, this could lead to an excessive production of pro-inflammatory cytokines.

An important study finding is the epistatic relationship observed between *IL23R rs11209026* and *TNF rs1800629* polymorphisms. The A allele has been related to

increased TNF expression levels (Wilson et al. 1997), and it is well known that pro-inflammatory cytokines such as *TNF* are associated with a poor clinical outcome in AP (Nieminen et al. 2014, Norman 1998, Rodriguez-Nicolas et al. 2018). We found no association of the studied polymorphisms with idiopathic or biliary AP.

In summary, *IL23R rs11209026* and *RIPK2 rs42490* polymorphisms may impact on the development and severity of AP. Specifically, the *IL23R rs11209026* A allele heightens the risk of AP, and interaction between *IL23R rs11209026* and *TNF rs1800629* significantly increases susceptibility to this disease. In addition, the *RIPK2 rs42490*-G allele appears to be related to a greater risk of severe or moderately severe AP and death. Our study was limited by the relatively small number of severe cases, and further research is warranted in wider samples to verify our findings and identify therapeutic targets that might reduce the mortality rate of this highly prevalent disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Eva García for technical assistance. This study is part of the doctoral thesis of Antonio Rodriguez-Nicolas.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by the grants from Spanish Institute of Health Carlos III (ISCIII, Instituto Carlos III) co-financed by the European Union (FEDER-Fondo

ANEXO

Europeo de Desarrollo Regional) (PI11/01386, PI16/00752, RETIC RD 06/020, RD09/0076/00165) and the Andalusian Regional Government in Spain (CTS-143). FDC received a “Ramón y Cajal” grant (RYC-2014-16458) from the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness.

REFERENCES

- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278, 1910-1914.
- Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, et al. (2007). Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5, 972-976.
- Balog A, Gyulai Z, Boros LG, et al. (2005). Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas*, 30, e46-50.
- Banks PA (2002). Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc*, 56, S226-230.
- Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. (2013). Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*, 62, 102-111.
- Bao XB, Ma Z, Gu JB, et al. (2015). IL-8 -251T/A polymorphism is associated with susceptibility to acute pancreatitis. *Genet Mol Res*, 14, 1508-1514.
- Bettelli E, Korn T and Kuchroo VK (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 19, 652-657.
- Bishehsari F, Sharma A, Stello K, et al. (2012). TNF-alpha gene (TNFA) variants increase risk for multi-organ dysfunction syndrome (MODS) in acute pancreatitis. *Pancreatology*, 12, 113-118.
- Blaschitz C and Raffatellu M (2010). Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J Clin Immunol*, 30, 196-203.
- Bradley EL, 3rd (1993). 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*, 128, 586-590.
- Cavallini G, Frulloni L, Bassi C, et al. (2004). Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Dig Liver Dis*, 36, 205-211.
- Di Meglio P, Di Cesare A, Laggner U, et al. (2011). The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS One*, 6, e17160.
- Dubin PJ and Kolls JK (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*, 226, 160-171.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314, 1461-1463.

ANEXO

- Fang F, Pan J, Xu L, et al. (2015). Association between chemokine (C-C motif) ligand 2 gene -2518 A/G polymorphism and pancreatitis risk: a meta-analysis. *Pancreatology*, 15, 53-58.
- Favre D, Lederer S, Kanwar B, et al. (2009). Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog*, 5, e1000295.
- Foitzik T (2001). The enteral factor in pancreatic infection. *Pancreatology*, 1, 217-223.
- Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, et al. (2006). The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas*, 33, 336-344.
- Frossard J-L, Steer ML and Pastor CM (2008). Acute pancreatitis. *The Lancet*, 371, 143-152.
- Ghosh S and Karin M (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.
- Guglani L and Khader SA (2010). Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS*, 5, 120-127.
- Jaffer U, Wade RG and Gourlay T (2010). Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*, 2, 161-175.
- Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, et al. (2004). Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*, 13, 35-45.
- Kolls JK and Khader SA (2010). The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 443-448.
- Koziel D, Gluszek S, Kowalik A, et al. (2015). Genetic mutations in SPINK1, CFTR, CTSC genes in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol*, 15, 70.
- Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al. (2008). Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J Gastroenterol*, 14, 4643-4651.
- Li Y, Mao Q, Shen L, et al. (2010). Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and Crohn's disease susceptibility: a meta-analysis. *Inflamm Res*, 59, 607-614.
- Liu Y, Sun J-K, Qi X, et al. (2017). Expression and Significance of Th17 and Treg Cells in Pulmonary Infections with Gram-Negative Bacteria. *Immunological Investigations*, 46, 730-741
- Matas-Cobos AM, Redondo-Cerezo E, Alegria-Motte C, et al. (2015). The role of Toll-like receptor polymorphisms in acute pancreatitis occurrence and severity. *Pancreas*, 44, 429-433.
- Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, et al. (2014). ImmunoChip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet*, 94, 47-61.

- Nieminen A, Maksimow M, Mentula P, et al. (2014). Circulating cytokines in predicting development of severe acute pancreatitis. *Crit Care*, 18, R104.
- Norman J (1998). The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*, 175, 76-83.
- Omenetti S and Pizarro TT (2015). The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*, 6, 639.
- Pallikkuth S, Micci L, Ende ZS, et al. (2013). Maintenance of intestinal Th17 cells and reduced microbial translocation in SIV-infected rhesus macaques treated with interleukin (IL)-21. *PLoS Pathog*, 9, e1003471.
- Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, et al. (2009). NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*, 5, e1000500.
- Papachristou GI, Sass DA, Avula H, et al. (2005). Is the monocyte chemotactic protein-1 -2518 G allele a risk factor for severe acute pancreatitis? *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3, 475-481.
- Pfutzer R, Myers E, Applebaum-Shapiro S, et al. (2002). Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*, 50, 271-272.
- Pidasheva S, Trifari S, Phillips A, et al. (2011). Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS One*, 6, e25038.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 81, 559-575.
- Rahman P, Inman RD, Gladman DD, et al. (2008). Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 58, 1020-1025.
- Rodriguez-Nicolas A, Martinez-Chamorro A, Jimenez P, et al. (2018). TH1 and TH2 Cytokine Profiles as Predictors of Severity in Acute Pancreatitis. *Pancreas*, 47, 400-405.
- Sarin R, Wu X and Abraham C (2011). Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9560-9565.
- Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, 31, 331-341.
- Thiebaut R, Douchin V, Jung C, et al. (2011). RIP2 polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 17, 1055.
- Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, et al. (2002). Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 17 Suppl, S15-39.

ANEXO

- Vege SS, Yadav D and Chari ST (2007). Pancreatitis. *Gi Epidemiology*, 221-225.
- Watanabe T, Kudo M and Strober W (2016). Immunopathogenesis of pancreatitis. *Mucosal Immunology*, 10, 283.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 25, 821-852.
- Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, et al. (2008). ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am J Gastroenterol*, 103, 621-627.
- Wellcome Trust Case Control C, Australo-Anglo-American Spondylitis C, Burton PR, et al. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*, 39, 1329-1337.
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. (1996). Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*, 14, 141-145.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3195-3199.
- Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. (2000). Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet*, 25, 213-216.
- Yadav D and Lowenfels AB (2006). Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas*, 33, 323-330.
- Yu, R.Y., Brazaitis, J., Gallagher, G. (2015). The human IL-23 receptor rs11209026 A allele promotes the expression of a soluble IL-23R-encoding mRNA species. *J. Immunol*, 194, 1062-1068.
- Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martinez EJ, Duran-Avelar Mde J, et al. (2014). Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflam*, 2014, 651503.
- Zhang DL, Li JS, Jiang ZW, et al. (2003). Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute biliary pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 9, 824-828.
- Zhang FR, Huang W, Chen SM, et al. (2009). Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*, 361, 2609-2618.
- Zhang G and Ghosh S (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*, 107, 13-19.
- Zhao HF, Ito T, Gibo J, et al. (2005). Anti-monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy attenuates experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride in rats. *Gut*, 54, 1759-1767.

TABLES

	<i>Patients</i>
n	269
Age	64.58±18.2
Males (%)	127 (47.92%)
Females (%)	142 (52.8%)
Ethnicity (% Caucasian)	97.4%
Etiology	
<i>Gallstones</i>	177 (65.8%)
<i>Idiopathic</i>	41 (15.2%)
<i>Alcoholic</i>	28 (10.4%)
<i>Post-ERCP</i>	8 (3.0%)
<i>Other</i>	7 (5.6%)
CT scan	25.3%
MRI	3%
EUS	11.2%
Atlanta 2012 classification	Mild: 231 (85.9%) Moderately severe: 26 (9.7%) Severe: 12 (4.5%)
Local complications	
Acute fluid collections	25 (9.3%)
Pseudocyst	2 (0.7%)
Necrosis	6 (2.2%)
Systemic complications	
Organ failure	40 (14.87%)
Exacerbation of previous conditions	41 (15.24%)
ICU admissions	11 (4.1%)
Deaths	8 (3%)
Length of hospital stay	9.60 (range 2-90 days)
Length of ICU stay	13.64 (range 1-37 days)

Table 1. Demographical and clinical features of AP patients

ANEXO

	Genotype	Patients	Controls	P
		n (%)	n (%)	
<i>IL23R</i> <i>rs11209026</i>	AA	5 (1.9)	7 (0.5)	0.006433
	AG	46 (17.6)	207 (13.6)	
	GG	211 (80.5)	1303 (85.9)	
<i>TNF</i> <i>rs1800629</i>	AA	7 (2.6)	22 (1.5)	n.s.
	AG	57 (21.5)	337 (22.2)	
	GG	201 (75.8)	1158 (76.3)	
<i>RIPK2</i> <i>rs42490</i>	GG	54 (20.5)	280 (18.6)	n.s.
	GA	126 (47.7)	717 (47.4)	
	AA	84 (31.8)	515 (34.0)	
<i>NOD2</i> <i>rs9302752</i>	TT	21 (7.9)	112 (7.4)	n.s.
	TC	107 (40.2)	639 (41.1)	
	CC	138 (51.9)	766 (50.5)	
<i>MCP1</i> <i>rs1024611</i>	GG	18 (6.9)	93 (6.1)	n.s.
	GA	89 (34.0)	581 (38.3)	
	AA	155 (59.2)	842 (55.5)	
<i>NFKB1</i> <i>rs28362491</i>	del/del	30 (11.2)	28 (9.0)	n.s.
	del/ins	121 (45.0)	146 (46.8)	
	ins/ins	118 (43.9)	138 (44.2)	

del, -94ATTG deletion; ins, -94ATTG insertion

TABLE 2: Genotype comparison between patients and controls.

	Allele	Patients	Controls	P	OR
		2n (%)	2n (%)		
<i>IL23R</i> <i>rs11209026</i>	A	56 (10.7)	221 (7.3)	0.007542	1.523
	G	468 (83.3)	2813 (92.7)		
<i>TNF</i> <i>rs1800629</i>	A	71 (13.4)	381 (12.6)	n.s.	
	G	459 (86.6)	2653 (87.4)		
<i>RIPK2</i> <i>rs42490</i>	G	234 (44.3)	1277 (42.2)	n.s.	
	A	294 (55.7)	1747 (57.8)		
<i>NOD2</i> <i>rs9302752</i>	T	149 (28.0)	863 (28.4)	n.s.	
	C	383 (72.0)	2171 (71.6)		
<i>MCP1</i> <i>rs1024611</i>	G	125 (23.9)	767 (25.3)	n.s.	
	A	399 (76.1)	2265 (74.7)		
<i>NFKB1</i> <i>rs28362491</i>	del	181 (33.6)	202 (32.4)	n.s.	
	ins	357 (66.4)	422 (67.6)		

del, -94ATTG deletion; ins, -94ATTG insertion

TABLE 3: Allele comparison between patients and controls

	Allele	Controls 2n (%)	Severe AP		Severe or Moderately Severe AP		Non-survivors	
			Patients 2n (%)	P (OR)	Patients 2n (%)	P (OR)	Patients 2n (%)	P (OR)
<i>IL23R</i> <i>rs11209026</i>	A	221 (7.3)	1 (4.2)	n.s.	5 (6.6)	n.s.	1 (6.3)	n.s.
	G	2813 (92.7)	23 (95.8)		71 (93.4)		15 (93.7)	
<i>TNF</i> <i>rs1800629</i>	A	381 (12.6)	1 (4.2)	n.s.	12 (15.8)	n.s.	2 (12.5)	n.s.
	G	2653 (87.4)	23 (95.8)		64 (84.2)		14 (87.5)	
<i>RIPK2</i> <i>rs42490</i>	G	1277 (42.2)	16 (66.7)	0.01583 (2.736)	40 (54.1)	0.04206 (1.609)	11 (68.7)	0.03226 (3.010)
	A	1747 (57.8)	8 (33.3)		34 (45.9)		5 (31.3)	
<i>NOD2</i> <i>rs9302752</i>	T	863 (28.4)	6 (25.0)	n.s.	16 (21.1)	n.s.	3 (18.8)	n.s.
	C	2171 (71.6)	18 (75)		60 (78.9)		13 (81.2)	
<i>MCP1</i> <i>rs1024611</i>	G	767 (25.3)	7 (29.2)	n.s.	17 (23.0)	n.s.	5 (31.3)	n.s.
	A	2265 (74.7)	17 (70.8)		57 (77.0)		11 (68.7)	
<i>NFKB1</i> <i>rs28362491</i>	del	202 (32.4)	11 (45.8)	n.s.	30 (39.5)	n.s.	8 (50.0)	n.s.
	ins	422 (67.6)	13 (54.2)		46 (60.5)		8 (50.0)	

del, -94ATTG deletion; ins, -94ATTG insertion

TABLE 4: Allele comparison between controls and patients with severe AP, severe or moderately severe AP, and non-survivors.

Sample group	AA	Aa	aa	Epistatic interaction	
	BB:Bb:bb	BB:Bb:bb	BB:Bb:bb	OR _{interaction}	P
Controls	23:333:1160	5:57:190	1:3:8		
AP patients	2:37:170	4:18:23	1:1:3	4.031	1.205 x 10 ⁻⁵

AP: Acute Pancreatitis. OR: odds ratio. Major and minor alleles of *IL23R* *rs11209026* are denoted as A and a, respectively, and those of *TNF rs1800629* are denoted as B and b, respectively.

Table 5. Epistatic interaction between *rs11209026* and *rs1800629*