

ORIGINAL PAPERS

Pulmonary injuries and cytokine levels after the intraperitoneal administration of pancreatic homogenates in rats

G. Mozo, M. L. del Olmo, A. Caro-Patón, E. Reyes¹, L. Manzano¹, A. Belmonte, A. Almaraz and M. Álvarez-Mon¹

Department of Medicine. University of Valladolid. Spain. ¹Department of Immunology. University of Alcalá de Henares. Madrid. Spain

ABSTRACT

Introduction: our objective was to investigate the effects of the administration of pancreatic homogenates, with or without enzymatic activation, to healthy animals regarding cytokine serum levels and the development of pulmonary distress.

Material and methods: 106 male Wistar rats, divided into three groups, were studied: group A, intraperitoneal administration of homogenates activated with enterokinase; group B, homogenates without enterokinase; and group C, control group with administration of physiological saline solution. Each group was divided into 4 subgroups according to the time of sacrifice: 0, 2, 6 and 24 hours. We studied the pulmonary and pancreatic histology, serum parameters of renal and hepatic function, and serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF α .

Results: there was no mortality in any group. Pancreatic disorders in A and B groups were noted at 24 hours. These two groups had statistically significant higher transaminase serum levels than those of the control group, as well as statistically significant higher creatinine levels in group A. IL-1 β showed a statistically significant higher level at 6 h in both groups, A and B, but was higher in group A, which also exhibited significant pulmonary histologic damage with respect to controls at 6 h.

Conclusions: the higher IL-1 β level in group A may result from production by peritoneal macrophages under the influence of homogenate enzymatic activation. This may be the reason for lung damage.

Key words: Pancreatic ascites. Pancreatic homogenates. Interleukin-1 β . TNF α . Lung.

Mozo G, del Olmo ML, Caro-Patón A, Reyes E, Manzano L, Belmonte A, Almaraz A, Álvarez-Mon M. Pulmonary injuries and cytokine levels after the intraperitoneal administration of pancreatic homogenates in rats. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 527-538.

Recibido: 20-11-03.
Aceptado: 27-01-04.

Correspondencia: María Lourdes del Olmo Martínez. C/ Federico Landrove, 14, 3.º. 47014 Valladolid. e-mail: delolmo@uva.es

INTRODUCTION

During the course of severe acute pancreatitis (AP) the inflammatory process, which is initially localized and limited to the pancreas, may spread with the induction of a systemic inflammatory response that can progress and even cause multiple organ failure (MOF) (1-3). In these cases, there is an accumulation of leukocytes, mainly polymorphonuclear (PMN) cells, in various organs such as the kidney, liver and lung, in parallel to the severity of AP (4-6). The PMN adhesion process to vascular endothelial cells—and the subsequent extravasation and parenchymal infiltration—is mediated by proinflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-8. These are initially released from acinus cells and damaged peripancreatic tissues, and later produced in other organs (3,7-12).

Many works have thoroughly studied the contribution of pancreatic ascites to the pathophysiology, development and degeneration of AP and its systemic involvement (13-23). It has been demonstrated that during AP there is an increase in peritoneal permeability (24,25) that contributes to pancreatic enzyme transfer via the peritoneum to the thoracic duct (26). Moreover, in pancreatic ascites there are proinflammatory cytokines whose origin seems to be activated peritoneal macrophages (15,19,20,27), which contribute to the spreading of inflammation. Nevertheless, these cytokines do not seem to be the only inflammatory factors in ascites, since the latter will still induce systemic effects even in their absence (15,17-19,28-33). Peritoneal lavage has been proposed (34-36) as a measure to eliminate proinflammatory factors present in pancreatic ascites that may contribute to patient deterioration (1) by producing damaging effects on hemodynamics and organs such as the kidney, liver and lung (28,31,37-42). In the lung they can induce an adult respiratory distress syndrome (ARDS), as observed in experimental models when injecting this exudate into the pulmonary artery (33) or following an intravenous (17) or intraperitoneal method (i.p.) (24).

Experimental studies have employed i.p. administration of pancreatic homogenates as a method to simulate pancreatic ascites (43). It seems that a homogenate, once injected in a healthy rat, acquires fibrinolytic properties similar to those present in pancreatic ascites, which it did not previously possess. This appears to indicate that homogenates interact with the peritoneum (43).

The aim of this work was to study the effects produced by the administration of pancreatic homogenates with or without previous enterokinase activation on serum cytokine levels as well as on the development of alterations of pulmonary morphology in healthy animals.

MATERIAL AND METHODS

A total of 106 male Wistar rats were studied. The process was developed according to the rules established by the Ethics Committee of Valladolid Medicine School, as well as observing the rules stipulated in Decree 223/1988 of March 14 and those of Order October 13, 1989. The animals remained in cages of 5 individuals with alternating cycles of 12 light/dark hours, and free access to standard food and water until 12 hours before the beginning of experiments, when they were deprived of food but allowed free access to water.

The rats were distributed in three groups:

Group A. A total of 28 animals that received a pancreatic homogenate previously activated with enterokinase (EK).

Group B. A total of 28 animals that received a pancreatic homogenate without previous activation with EK.

Group C. A total of 50 control animals that received physiological saline solution in the same doses and times as those in groups A and B.

At the same time, each group was divided into subgroups according to the different sacrifice times: 0, 2, 6, and 24 hours after the administration of the homogenate.

Preparation and administration of the pancreatic homogenized solution

Eight female Wistar rats were used. They were fasted for 12 hours, but allowed free access to water, prior to sacrifice. Following anesthesia by an IP injection of 25 mg of sodium Pentothal (B. Braun Medical, Barcelona), a laparotomy and pancreas extraction using an aseptic technique were performed. The specimen obtained was immediately suspended in the proportion of 250 mg of tissue to 1.5 ml of sterile Tris buffer solution, pH 7.8, with Triton X 100. It was homogenized cold and centrifuged at a temperature of 4 °C. Each 20 ml of supernatant were incubated for 30 minutes at 37 °C with 2.22 ml of EK (Sigma, London) (5 mg/ml in a Tris buffer, pH 7.8), which was intended for animals in group A. In group B, the homogenate was incubated without EK.

Trypsin activity in homogenates was measured by using the Erlanger-Kokowsky-Cohen method (44), resulting in 120 IU/g of protein in the EK-activated homogenates and zero activity in samples incubated without EK. We previ-

ously observed that the i.p. administration of Triton X 100 (1/1000) did not induce any damage in the rat.

The prepared homogenates were i.p. injected at a dose of 0.5 ml in each animal, and this moment was considered zero time.

Animals were killed according to the established protocol by means of exsanguination by cardiac puncture following anesthesia with 25 mg of sodium pentothal injected i.p. Following a limited thoracotomy and right lung extraction, a wide medium laparotomy for pancreas extraction was also performed.

Biochemical and cytokine determinations

The blood obtained was kept on ice for 90 minutes until clot formation. After centrifugation the serum was taken and kept frozen until use at -20 °C for biochemical determinations, and at -80 °C for cytokine determinations.

Amylase, lipase, urea, creatinine, AST, ALT and glucose were determined in serum using a Hitachi 917 automatic analyzer. Hematocrit was determined by capillary centrifugation of heparinized blood.

Similarly, serum TNF α , IL-1 β and IL-6 levels were determined using specific ELISA kits for rats and for each cytokine. A kit with a sensitivity of 20-1000 pg/ml (Diacclone, France) was used for TNF α , one with a sensitivity of 10-1500 pg/ml (Endogen, USA) for IL-6, and one with a sensitivity of 3-2000 pg/ml (Biosource International, USA) for IL-1 β . The reading was done with a Delta Soft II spectrophotometer, version 4.1F (Biometallics, Inc.), with wavelengths of 450 nm using a LCII Macintosh computer.

Morphological study

The fresh right lung and pancreas of each animal were weighed and placed in a 10% formaldehyde solution. They were stained with hematoxylin/eosin. Both organs were studied with an optical microscope (Zeiss II, Inc., New York) using 200, 400 and 1000 magnification values. The parameters assessed in each organ were adjusted according to a scale from 0 to 3, and are listed in table I.

A comprehensive pancreatic and pulmonary histologic evaluation was established by calculating the mean of all histologic parameters for each organ following a method established by other authors (45,46).

The fresh organ weight/total corporal weight ratio for each animal—expressed as a percentage—was used as an estimation of tissular edema (lung or pancreas).

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The SPSS 6.1.2. software program was used. We used Mann Whitney's non-parametric U test for comparison of means, and established $p < 0.05$ as the statistical significant value.

Table I. Histological parameters evaluated in the pancreas and lung (score from 0 to 3)

Pancreas	0	1	2	3
<i>Pancreatic edema</i> (separation between acini –in µm– in a small lobe)	Juxtaposed	0,5-1 µm	1-1,5 µm	> 1,5 µm
<i>Inflammatory infiltrate</i> (presence of PMN in the interstice per 100 acini evaluated)	Absence	< 5	5-10	> 10
<i>Apoptosis</i> (no. of acini with images of apoptotic nuclei per 100 acini evaluated)	Absence	0-5	5-10	> 10
<i>Vacuolization</i> (cells contained in 100 acini having vacuoles)	Absence	0-10	10-25	> 25
Lung				
<i>Inflammatory infiltrate</i> (PMN in alveolar capillaries, examining 5 per 400x field)	Absence	< 5	5-10	>10
<i>Interstitial edema</i> (average density –in µm– of the alveolar septa of 10 per 400x field)	< 10 µm	10-15 µm	15-20 µm	> 20 µm
<i>Interstitial hemorrhage</i> : rated from 0 to 3 according to the presence of red blood cells /erythrocytes in the interstice				
<i>Pulmonary structure</i> : rated from 0 to 3 according to structural disruption level				

PMN: polymorphonuclear leukocytes.

RESULTS

There was no mortality in any group of the study.

Enzymatic levels in both homogenates

Lipase and amylase levels in homogenates without EK activation were higher than those in activated homogenates (lipase 122.1 KU/ml *versus* 97.2 KU/ml, amylase 298.7 U/ml against 258.3 U/ml).

Transaminase levels were also higher in homogenates without EK activation than in activated homogenates (AST 6430 mU/ml against 3450 mU/ml, ALT 2135 mU/ml against 312 mU/ml).

Total protein results showed a greater concentration in homogenates without EK activation (1.81 g/dl *vs* 1.13 g/dl in homogenates with EK activation).

Pancreatic evaluation

There were no macroscopic pancreatic alterations in groups A and B with relation to controls, nor were there any differences in the pancreatic weight/corporal weight ratio.

Significant higher levels of serum amylase at 2 and 6 h were evident only in group B when compared to the control group. Serum lipase showed slightly higher values in both groups (A and B) at 2 and 6 h, with statistically significant differences with respect to the control group (Table II). At 6 h, group B had significantly higher levels of serum amylase than group A. The same occurred at 2 and 6 h with serum lipase (Table II).

The histological study of the pancreas showed the presence of inflammatory acinar infiltration and pancreatic edema at 24 h in group A (with EK), a significant difference with respect to the control group. In the group with EK-free

homogenates (B) we noticed inflammatory infiltration of acini and slight apoptosis at 24 h, with the presence of acinar edema at 2, 6 and 24 h, all of which was significant with respect to the control group and at 2 and 24 h with respect to group A (Table III).

Serum transaminases and renal function parameters

At 2 and 6 h both experimental groups showed AST levels significantly higher than the control group, but ALT levels were higher only in group B with respect to groups C and A (Table II).

There were no differences in urea between groups. Only in group A did creatinine stand at significantly higher levels than in group C at 6 h. No differences were observed either in glucose level or hematocrit (Table II).

Serum levels of IL-1 β , TNF α and IL-6 (Table II)

The determination of serum IL-1 β showed significantly higher levels at 6 h in both groups A and B compared to the control group, the highest value occurring in group A (58.8 pg/ml) in contrast to group B (22.4 pg/ml). The same occurred at 0 hrs in group B (Table II).

IL-6 results showed no detectable values in any group.

TNF α results showed no statistically significant differences when comparing between groups A and B, and these with the control group at the various time points of the experiment.

Pulmonary histologic alterations

In group A we observed a greater alteration of lung architecture at 6 h compared to the control group, together with a

Table II. Laboratory findings, including serum cytokines, in the different experimental groups. Results are expressed as mean \pm SEM

Group	Time	Amylase mU/ml	Lipase U/ml	AST/GOT mU/ml	ALT/GPT mU/ml	Urea mg/dl	Creatinine mg/dl	Glucose mg/dl	Hematocrit %	IL-1 β pg/ml	TNF- α pg/ml
A	n = 5 0 h	1909 \pm 133	74.6 \pm 16	134 \pm 23	30 \pm 3	47.4 \pm 3	0.5 \pm 0.02	159 \pm 2.9	40 \pm 1.8	25.3 \pm 12	34 \pm 13
	n = 8 2 h	2721 \pm 288	111 \pm 28*	139 \pm 8.8*	27 \pm 1.6	42.9 \pm 3	0.5 \pm 0.02	139 \pm 7.8	42.4 \pm 1	75.8 \pm 31.7	35.8 \pm 6.8
	n = 8 6 h	2314 \pm 131	23.3 \pm 12*	143 \pm 10*	29 \pm 3	40 \pm 1	0.6 \pm 0.02*	121 \pm 8	43.8 \pm 1.5	58.8 \pm 32.5*	24.8 \pm 3.7
	n = 7 24 h	1241 \pm 140	49 \pm 31	143 \pm 5	33 \pm 2.2	54.3 \pm 3+	0.6 \pm 0.03	156 \pm 28	42.6 \pm 3	59.3 \pm 38	58 \pm 9
B	n = 7 0 h	2405 \pm 250	359 \pm 134*	120 \pm 10	26 \pm 1.8	42 \pm 2	0.6 \pm 0.01	163 \pm 8.9	44 \pm 2.4	71.2 \pm 26*	43.2 \pm 4.9
	n = 7 2 h	3780 \pm 197*+	479 \pm 108*+	171 \pm 15*	43 \pm 2.3*+	43 \pm 1.5	0.5 \pm 0.01	148 \pm 11	43.9 \pm 2.6	109 \pm 54	42 \pm 3.8
	n = 7 6 h	2056 \pm 146	123 \pm 35*+	192 \pm 31*	49 \pm 6.8*+	48 \pm 2.4*+	0.6 \pm 0.02*	113 \pm 7.8	46 \pm 1.7	22.4 \pm 7.4*	49 \pm 8
	n = 7 24 h	1254 \pm 78	20 \pm 9	137 \pm 11	31 \pm 1.9	37.3 \pm 2.7	0.5 \pm 0.02	124 \pm 6.7	44.6 \pm 1	30.7 \pm 11	39 \pm 6.6
C	n = 11 0 h	2009 \pm 128	44.7 \pm 24	146 \pm 24	38 \pm 5	44.6 \pm 1.7	0.6 \pm 0.02	127 \pm 14	43.8 \pm 1.7	25.1 \pm 18	53.4 \pm 14
	n = 13 2 h	2147 \pm 160	13.3 \pm 8	103 \pm 5	28 \pm 1	38.7 \pm 1	0.5 \pm 0.01	126 \pm 9	42.1 \pm 2	76 \pm 32	39.8 \pm 6
	n = 13 6 h	2113 \pm 131	12.5 \pm 7	118 \pm 11	30 \pm 1.9	37.1 \pm 1.7	0.5 \pm 0.01	132 \pm 11	44.8 \pm 1.6	2.1 \pm 1.4	31.2 \pm 4.8
	n = 13 24 h	1309 \pm 59	11.2 \pm 4.5	122 \pm 6.7	32 \pm 2	44.2 \pm 3	0.6 \pm 0.01	122 \pm 7.4	46.3 \pm 1.8	18.8 \pm 9.9	45.4 \pm 4.8

*Statistically significant difference versus control group mean values ($p \leq 0.05$)

+Statistically significant difference when comparing group A versus group B (mean values) ($p \leq 0.05$)

Group A: EK-activated homogenates; group B: non EK-activated homogenates; group C: control.

Table III. Pancreatic weights and histology in the different experimental groups. Results are expressed as mean \pm SEM

Group	Time	Pancreatic vacuolization	Pancreatic inflammatory infiltrate	Pancreatic edema	Acinar apoptosis	Pancreatic histology (global evaluation)	Pancreatic weight/body weight
A	n = 5 0 h	0	0	0	0	0	0.22 \pm 0.04
	n = 8 2 h	0.13 \pm 0.3	0	0.13 \pm 0.3	0	0.06 \pm 0.1	0.23 \pm 0.02
	n = 8 6 h	0	0.13 \pm 0.1	0.13 \pm 0.3	0	0.06 \pm 0.1	0.22 \pm 0.01
	n = 7 24 h	0	0.29 \pm 0.4*	0	0	0.07 \pm 0.1*	0.22 \pm 0.01
B	n = 7 0 h	0	0	0.14 \pm 0.1	0	0.04 \pm 0.04	0.29 \pm 0.02
	n = 7 2 h	0	0	0.71 \pm 0.1*+	0	0.18 \pm 0.05*	0.26 \pm 0.01
	n = 7 6 h	0	0	0.5 \pm 0.3*	0	0.13 \pm 0.09	0.22 \pm 0.02
	n = 7 24 h	0	1 \pm 0.5*	1 \pm 0.3*+	0.5 \pm 0.2*	0.63 \pm 0.2*+	0.23 \pm 0.01*
C	n = 11 0 h	0	0	0	0	0	0.25 \pm 0.02
	n = 13 2 h	0	0	0	0	0	0.22 \pm 0.01
	n = 13 6 h	0	0	0	0	0	0.22 \pm 0.02
	n = 13 24 h	0	0	0	0	0	0.17 \pm 0.01

*Statistically significant difference when comparing group A to group B (mean values) ($p \leq 0.05$)

+Statistically significant difference versus control group mean values ($p \leq 0.05$)

Group A: EK-activated homogenates; group B: non EK-activated homogenates; group C: control.

more important presence of alveolo-capillary pulmonary edema during the same time period with statistically significant differences. The remaining parameters showed no significant findings. In group B no alteration was noted versus the control group in any of the parameters analyzed (Table IV, Fig. 1).

The evaluation of the right lung weight/body weight ratio showed no difference between groups.

DISCUSSION

According to our study, no significant pancreatic alteration occurred in experimental groups A and B, as was expected. The very mild presence of an inflammatory infiltrate and interstitial edema in both groups at 24 h may be associated with a possible late attack on the pancreas, probably by

an immunologic mechanism (the administration of pancreatic homogenates coming from another animal may generate an immune response against the viscera itself). A more remote possibility, however, would be that the IL-1 β increase produced in these groups at 6 h could have triggered late selective chemotaxis on the pancreas. In any case, these alterations are so mild that they seem to have no influence both on pulmonary involvement and cytokine production, since such phenomena develop in earlier stages.

Given the absence of pancreatic injury, serum lipase and amylase increases may be due to the peritoneal absorption of enzymes contained in the administered homogenates, which also occurs in pancreatic ascites (47,48). Differences in serum lipase and amylase between groups A and B—higher in B—correspond to the higher lipase and amylase activity observed in homogenates not activated by EK. It seems reasonable to think that the lower enzyme levels in EK-activat-

Table IV. Pulmonary weights and histology in the different experimental groups. Results are given as mean \pm SEM

Group	Time	Pulmonary inflammatory infiltrate	Pulmonary interstitial hemorrhage	Pulmonary structure	Pulmonary edema	Pulmonary histology (global evaluation)	Pulmonary weight/body weight
A	n = 5 0 h	0.2 \pm 0.2	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4	0.4 \pm 0.2	0.21 \pm 0.02
	n = 8 2 h	0	0.38 \pm 0.1	0.75 \pm 0.3	0.75 \pm 0.3	0.47 \pm 0.1	0.27 \pm 0.05
	n = 8 6 h	0.5 \pm 0.1	0.88 \pm 0.3	1.13 \pm 0.2*+	1.25 \pm 0.2*+	0.94 \pm 0.2*+	0.22 \pm 0.02
	n = 7 24 h	0.14 \pm 0.1	0.14 \pm 0.1	0.29 \pm 0.1	0.43 \pm 0.2	0.25 \pm 0.1	0.43 \pm 0.1
B	n = 7 0 h	0	0	0.14 \pm 0.1	0.14 \pm 0.1	0.07 \pm 0.07	0.20 \pm 0.01
	n = 7 2 h	0.67 \pm 0.3+	0.17 \pm 0.1	0.17 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3	0.38 \pm 0.1	0.20 \pm 0.01
	n = 7 6 h	0.14 \pm 0.1	0.29 \pm 0.2	0.43 \pm 0.2	0.43 \pm 0.2	0.32 \pm 0.1	0.29 \pm 0.04
	n = 7 24 h	0.17 \pm 0.1	0.67 \pm 0.2	0.67 \pm 0.2	0.83 \pm 0.4	0.58 \pm 0.2	0.20 \pm 0.01
C	n = 11 0 h	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.26 \pm 0.03
	n = 13 2 h	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.24 \pm 0.03
	n = 13 6 h	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.25 \pm 0.03
	n = 13 24 h	0	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.22 \pm 0.04

*Statistically significant difference versus control group mean values ($p \leq 0.05$)

+Statistically significant difference when comparing group A versus group B ($p \leq 0.05$)

Group A: EK-activated homogenates; group B: non EK-activated homogenates; group C: control.

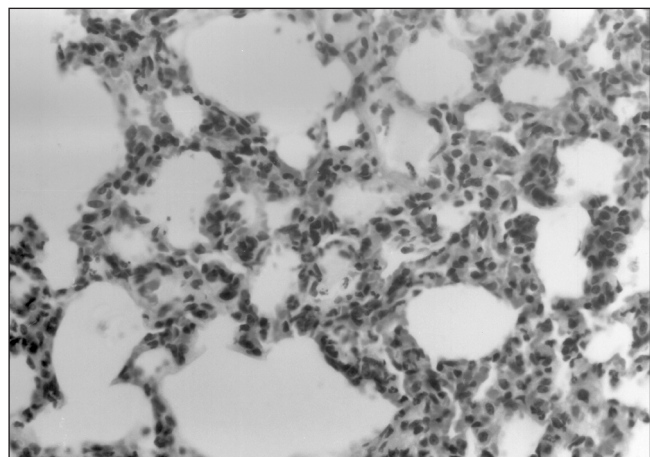


Fig. 1.- Pulmonary parenchyma of a rat administered with EK incubated homogenates (6 hrs). Altered pulmonary architecture, edema and interstitial hemorrhage with inflammatory infiltrate are observed (H&E x 400).

Parénquima pulmonar de una rata a la que se había administrado un homogeneizado pancreático activado con EK (6 horas). Se observa alteración de la arquitectura pulmonar, edema y hemorragia intersticial e infiltrado inflamatorio (H&E x 400).

ed homogenates may be a result of their digestion by the trypsin present therein.

Higher ALT levels at 2 and 6 h in group B may also be interpreted in this way. However, several studies have demonstrated the presence of liver cell apoptosis in healthy animals after the i.p. administration of pancreatic homogenates (42). Similarly, the pancreatic homogenates used in our study may have had that same effect.

The absence of detectable serum IL-6 levels and of significant differences in TNF α may be explained by the fact that the injuries induced were not of sufficient intensity, as has been evidenced in other experimental works and in humans (39,49,50).

IL-1 β levels remained elevated in both experimental groups, showing significant differences compared with the

control group after 6 hours, when this cytokine reached peak levels. As homogenates come from a healthy rat without pancreatic inflammation, it appears that this is not the origin of this cytokine. Although we have not studied the peritoneum from a histologic point of view, there have been previous works using models equivalent to ours which ruled out the presence of inflammatory signs in the peritoneum (31), suggesting that IL-1 β elevation in groups A and B is not due to the existence of peritoneal inflammation. It seems that neither the pancreas nor the lung are likely to be the origin of this cytokine, since no injury existed prior to the significant increase of IL-1 β . Therefore, we suggest that the most likely origin of this cytokine is peritoneal macrophages. A number of studies have demonstrated that pro-inflammatory cytokines and regulatory proteins for the transcription of pro-inflammatory genes, such as NF κ B, are produced by peritoneal and splenic macrophages upon stimulation by pancreatic homogenates lacking endotoxine and cytokines (15,18-20,28-33).

If we take into account that the pancreatic enzymes released to the circulation do not seem to influence the production of cytokines by macrophages (19,20), there must be a factor of pancreatic origin contained in our homogenates that is not dependent on the prior existence of pancreatic injury interacting with the peritoneal macrophages and stimulating them to produce IL-1 β .

The fact that in group A, IL-1 β levels at hour 6 were higher than in group B, and that only group A rats had significant pulmonary injuries, suggests that the unknown factor may be found in larger amounts in activated homogenates (a product of the transformation by activated enzymes of some pancreatic protein?). Another possibility would be that the presence of activated enzymes contributed to the effect of this factor on peritoneal macrophages, and although it appears that enzymes are not directly responsible for these phenomena, they are likely to help them (18,20,21,23).

As for the study of pulmonary morphology, our findings are consistent with an alteration of normal pulmonary struc-

ture and the presence of mild pulmonary edema, statistically significant in comparison with groups B and C also at 6 h. The absence of differences in lung weight may be due to the low grade of edema, with absence of macroscopic findings, together with a sample error, since removed right lungs had not exactly the same size in all animals, and a clear parallel relationship is not always present between lung size and body size.

It is difficult to establish the role that activated enzymes of homogenates may have played in generating these lung injuries. A recent work shows greater lung injury associated with AP when administering intravenous EK in order to activate pancreatic enzymes, which remained outside the acini. However, this procedure caused a further aggravation of pancreatic injury; therefore, increased lung damage must be more attributable to greater AP severity than to the activity of pancreatic enzymes on the lung (51). We know that activated enzymes do not induce pulmonary injury by themselves (18). Furthermore, it is clear that a narrow relationship exists between the presence of pro-inflammatory cytokines and the appearance of pulmonary injury, not only in AP but also in other diseases (52-56). With these facts in mind, we must associate pulmonary alterations present in group A with the higher IL-1 β levels detected. Nevertheless, IL-1 β was higher in group B at 2 h, although without significant differences *versus* group A. This suggests that lung damage is not induced by this cytokine alone. Therefore, it may be that some other factor generated within the EK-activated homogenate is involved in this lesion.

In summary, pulmonary injuries were observed only in animals treated with activated homogenates, where IL-1 β levels were significantly higher. This may imply that pancreatic enzymes are potential facilitators of a supposed interaction between activated homogenates and peritoneal macrophages. In case of true pancreatic ascites all these elements in conjunction with pancreatic inflammation would converge, thus undoubtedly generating higher levels of pro-inflammatory cytokines and systemic alterations.

REFERENCES

- Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83.7.
- Ogawa M. Acute pancreatitis and cytokines: "Second Attack" by septic complication leads to organ failure. *Pancreas* 1998; 16: 312-5.
- Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30: 343-56.
- Werner J, Dragotakes SC, Fernández-del Castillo C, Rivera JA, Ou J, Rattner DW, et al. Technetium-99m-labeled white blood cells. A new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 1998; 227: 86-94.
- Werner J, Z'graggen K, Fernández-del Castillo C, Lewndrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 1999; 226: 834-42.
- O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 15-20.
- Osman MO, Lausten SB, Jakobsen NO, Kristensen JU, Deleuran B, Larsen CG, et al. Graded experimental acute pancreatitis monitoring of a renewed rabbit model focusing on the production of interleukin-8 (IL-8) and CDI1b/CDI8. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 137-49.
- Gukovskaya A, Gukosky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, et al. Pancreatic acinar cells produce, release and respond to Tumor Necrosis Factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 1853-62.
- Chen C-C, Wang S-S, Lu R-H, Chang F-Y, Lee S-D. Serum interleukin 10 and interleukin 11 in patients with acute pancreatitis. *Gut* 1999; 45: 895-9.
- Vaccaro MI, Ropolo AA, Grasso D, Calvo EL, Ferreira M, Iovanna JL, et al. Pancreatic acinar cells submitted to stress activate TNF-alpha gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 485-90.
- Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton CH, et al. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for Distant Organ Dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1783-88.
- Kim H, Seo JY, Kim KH. NF-kappaB and cytokines in pancreatic acinar cells. *J Korean Med Sci* 2000; 15 (Supl. 1): S53-4.
- Masamune A, Shitnosegawa T, Kimura K, Fujita M, Sato A, Koizumi M, et al. Specific induction of adhesion molecules in human vascular endothelial cells by rat experimental pancreatitis-associated ascitic fluids. *Pancreas* 1999; 18: 141-50.
- Takase K, Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y, Yamamoto M, et al. Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 1999; 125: 411-20.
- Satoh A, Shimosegawa T, Masamune A, Fujita M, Koi M, Toyota T. Ascitic fluid of experimental severe acute pancreatitis modulates the function of peritoneal macrophages. *Pancreas* 1999; 19: 268-75.
- Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor-beta 1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 641-9.
- Denham W, Jun Y, Wang H, Botchkina G, Tracey KJ, Norman J. Inhibition of p38 mitogen activate kinase attenuates the severity of pancreatitis-induced adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000; 28: 2567-72.
- Walsh CJ, Leeper-Woodford SK, Carey PD. CD18 adhesion receptors, tumor necrosis factor and neutropenia during septic lung injury. *J Surg Res* 1991; 50: 323-9.
- Denham W, Yang J, Norman J. Evidence for an unknown component of pancreatic ascites that induces adult respiratory distress syndrome through an interleukin-1 and tumor necrosis factor-dependent mechanism. *Surgery* 1997; 122: 295-302.
- Denham W, Yang J, Fink G, Zervos EE, Carter G, Norman J. Pancreatic ascites as a powerful inducer of inflammatory cytokines. The role of known vs unknown factors. *Arch Surg* 1997; 132: 1231-6.
- Lundberg AH, Eubanks JW 3rd, Henry J, Sabek O, Kotb M, Gaber L, et al. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas* 2000; 21: 41-51.
- Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via inflammatory mediators. *J Surg Res* 2000; 90: 95-101.
- Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Nonnan J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000; 128: 225-31.
- Marotta F, Fesce E, Rezakovic I, Chui DH, Suzuki K, Ideo G. Nafamostat Mesilate on the course of acute pancreatitis. Protective effect on peritoneal permeability and relation with supervening pulmonary distress. *Int J Pancreatol* 1994; 16: 51-9.
- Sevensson C, Sjö Dahl R, Tagesson C, Ihse I. Increased peritoneal permeability in acute experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1989; 4: 83-90.
- Egdahl RH. Mechanism of blood enzyme changes following production of experimental pancreatitis. *Ann Surg* 1958; 148: 389-400.
- Marton J, Szasz Z, Nagy Z, Jarmay K, Takacs T, Lonovics J, et al. Beneficial effect of octreotide treatment in acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1998; 24: 203-10.
- Ofstad E. Formation and destruction of plasma kinins during experimental acute hemorrhagic pancreatitis in dogs. *Scand J Gastroenterol* 1970; 5 (Supl. 5): 9.
- Ohlsson K, Tegner H. Experimental pancreatitis in the dog. Demonstration of trypsin in ascitic fluid, lymph and plasma. *Scand J Gastroenterol* 1973; 8: 129.

30. Thal AP, Kobold E, Hollenberg M. The release of vasoactive substances in acute pancreatitis. *Am J Surg* 1954; 105: 708.
31. Ellison EC, Pappas TN, Johnson JA, Fabri PJ, Carey LC. Demonstration and characterization of the hemo-concentrating effect of ascitic fluid that accumulate during haemorrhagic pancreatitis. *J Surg Res* 1981; 30: 241-8.
32. Satoh A, Shimosegawa T, Kimura K, Moriizumi S, Masamune A, Koizumi M, et al. Nitric oxide is overproduced by peritoneal macrophages in rat taurocholate pancreatitis: the mechanism of inducible nitric oxide synthase expression. *Pancreas* 1998; 17: 402-11.
33. Innes J, Frase I, Carey LC. The vasoactive properties of ascitic fluid in acute pancreatitis in a porcine model. *Arch Surg* 1986; 121: 665-8.
34. Ranson JHC, Spencer FC. Role of peritoneal lavage in severe acute pancreatitis. *Ann Surg* 1978; 187: 565-75.
35. Stone NN, Fabian TC. Peritoneal dialysis in the treatment of acute alcoholic pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1980; 150: 878-82.
36. Yokoi H, Naganuma T, Higashiguchi T, Isaji S, Kawarada Y. Prospective study of a protocol for selection of treatment of acute pancreatitis based on scoring of severity. *Digestion* 1999; 60 (Supl. 1): 14-8.
37. Frey CF, Wong HN, Hickman D, Pullos T. Toxicity of hemorrhagic ascitic fluid associated with hemorrhagic pancreatitis. *Arch Surg* 1990; 117: 401-4.
38. Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, Shinkai M, Takase K, Goshima M, et al. Hepatocyte growth factor increases in injured organs and functions as an organotrophic factor in rats with experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2000; 20: 84-93.
39. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 1993; 66: 41-5.
40. Coticchia JM, Lessler MA, Carey LC, Gower WR, Mayer AD, McMahon MJ, et al. Peritoneal fluid in human acute pancreatitis blocks hepatic mitochondrial respiration. *Surgery* 1986; 100: 850-6.
41. Bielecki JW, Clugosz J, Pawlicka E, Gabryelewicz A. The effect of pancreatitis associated ascitic fluid on some functions of rat liver mitochondria: a possible mechanism of the damage to the liver in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1989; 5: 145-56.
42. Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 55-64.
43. Etoh Y, Sumi H, Tsushima H, Maruyama M, Mihara H. Fibrinolytic enzymes in ascites during experimental acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 127-37.
44. Erlanger BF, Kokowsky N, Coh W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 1961; 95: 271-8.
45. Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, et al. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. *Ann Surg* 1995; 221: 625-34.
46. Kruse P, Hage E, Lason A. Proteases and inhibitors in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1999; 25: 113-21.
47. Mayer AD, Airey M, Hodgson J, McMahon J. Enzyme transfer from pancreas to plasma during acute pancreatitis. The contribution of ascitic fluid and lymphatic drainage of the pancreas. *Gut* 1985; 26: 876-81.
48. Waterman NG, Walsky RS. Transperitoneal absorption of amylase in acute experimental pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1970; 131 (4): 729-32.
49. Biffi WL, Moore EE, Moore FA. Interleukin-6 in the injured patients. Marker of injury or mediator of inflammation. *Ann Surg* 1996; 224: 647-64.
50. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; 86: 1243-54.
51. Hartwig W, Werner J, Jiménez R, Z'graggen K, Weimann J, Lewndrowski KB, et al. Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol* 1999; 277 (Gastrointest. Liver Physiol.40): G1008-G1016.
52. Sameshima H, Ikei S, Mori K. The role of tumor necrosis factor- α in the aggravation of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1993; 14: 107-15.
53. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer J-M. High bronchoalveolar levels of Tumor Necrosis Factor and its inhibitors, Interleukin-1, Interferon, and Elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1016-22.
54. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993; 341: 643-47.
55. Montravers P, Chollet-Martin S, Marmuse JP. Lymphatic release of cytokines during acute lung injury complicating severe pancreatitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1527-33.
56. Mozo G, del Olmo ML, Caro-Patón A, Reyes E, Manzano L, Belmonte A, et al. Afectación pulmonar y niveles de citocinas en un modelo de pancreatitis aguda experimental. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 53-9.

Lesiones pulmonares y niveles de citoquinas tras la administración intraperitoneal de homogeneizado pancreático en ratas

G. Mozo, M. L. del Olmo, A. Caro-Patón, E. Reyes¹, L. Manzano¹, A. Belmonte, A. Almaraz y M. Álvarez-Mon¹

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. ¹Departamento de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid

RESUMEN

Introducción: nuestro objetivo es investigar, en animales sanos, los efectos de la administración de homogeneizado pancreático, con y sin activación enzimática, sobre los niveles séricos de citoquinas y el desarrollo de lesiones pulmonares.

Material y métodos: se estudiaron 106 ratas Wistar macho divididas en 3 grupos: A: administración intraperitoneal de homogeneizado pancreático activado con enteroquinasa; B: homogeneizado sin enteroquinasa; y C: control, con la administración de

siero fisiológico. Cada grupo fue dividido en 4 subgrupos de acuerdo al tiempo de sacrificio: 0, 2, 6 y 24 horas. Estudiamos la histología pancreática y pulmonar, parámetros séricos de función renal, hepática y los niveles séricos de IL-1 β , IL-6 y TNF α .

Resultados: no hubo mortalidad en ningún grupo. Se observaron alteraciones pancreáticas en los grupos A y B a las 24 horas. Estos dos grupos presentaron niveles de transaminasas significativamente más elevados que aquellos del grupo control. Los niveles séricos de creatinina estaban más elevados en el grupo A. Los valores de IL-1 β fueron significativamente más altos a las 6 horas en

ambos grupos A y B, aunque mayor en el grupo A, el cual también presentó más lesiones histológicas pulmonares en relación con los controles a las 6 horas.

Conclusiones: los niveles de IL-1 β más elevados en el grupo A podrían deberse a la activación enzimática del homogeneizado que podría inducir la producción de esta citoquina por los macrófagos peritoneales, lo que a su vez podría ser el promotor de las lesiones pulmonares.

Palabras clave: Páncreas. Pancreatitis. Interleucina 1 β . TNF α . Pulmón.

INTRODUCCIÓN

En el curso de una pancreatitis aguda grave, el proceso inflamatorio que inicialmente está localizado y limitado al páncreas puede extenderse, inducir una respuesta inflamatoria sistémica, la cual puede progresar hasta causar un fallo multiorgánico (FMO) (1-3). En estos casos hay una acumulación de leucocitos, preferentemente polimorfonucleares (PMN) en varios órganos, tales como el riñón, el hígado y el pulmón, que es paralelo a la gravedad de la PA (4-6). Los PMN se adhieren a las células endoteliales vasculares y su subsiguiente extravasación e infiltración parenquimatosa está mediada por las citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF α , la IL-1 β , la IL-6 y la IL-8. Estas citoquinas son inicialmente producidas por las células acinares y los tejidos peripancreáticos lesionados y más tarde producidos por otros órganos (3,7-12). Muchos trabajos han estudiado en profundidad la contribución que la ascitis pancreática pudiera tener en la patofisiología, desarrollo y degeneración de la PA y en la afectación sistémica (13-23). Se ha demostrado que durante la PA hay un incremento en la permeabilidad peritoneal (24,25) que contribuye al paso de las enzimas pancreáticas a través del peritoneo al conducto torácico (26). Además, en la ascitis pancreática se detectan citoquinas proinflamatorias, cuyo origen parece estar en los macrófagos peritoneales activados (15,19,20,27), que contribuyen a la generalización de la inflamación. Sin embargo, estas citoquinas no parecen ser los únicos factores inflamatorios presentes en la ascitis, ya que esta última continúa provocando efectos sistémicos aun cuando esté libre de ellas (15,17-19,28-33).

El lavado peritoneal se ha propuesto como una medida para eliminar los factores proinflamatorios (34-36) presentes en la ascitis pancreática, ya que contribuirían al deterioro de la enfermedad (1), produciendo alteraciones hemodinámicas y en órganos a distancia tales como el riñón, el hígado y el pulmón (28,31,37-42). En el pulmón pudiera inducir el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), como lo indican estudios experimentales cuando se inyecta este exudado en la arteria pulmonar (33) o por vía intravenosa (17) o intraperitoneal (i.p.) (24).

Estudios experimentales han empleado la administración i.p. de homogeneizado pancreático como un método que simula la ascitis pancreática (43). Parece que este homogeneizado, una vez inyectado en una rata sana, adquiere propiedades fibrinolíticas similares a las presentes en la ascitis pancreática que inicialmente no poseía. Ello parece indicar que el homogeneizado interacciona con el peritoneo (43).

El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos que en animales sanos provoca la administración de un homogeneizado pancreático con o sin activación previa con enteroquina, tanto en los niveles de citoquinas séricas como en el desarrollo de alteraciones en la morfología pulmonar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado un total de 106 ratas Wistar macho. El proceso fue efectuado de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, las cuales siguen las recomendaciones estipuladas en el Decreto 223/1988 de 14 de marzo y en la Orden de 13 de octubre de 1989. Los animales permanecieron en jaulas de 5 individuos con ciclos alternantes de 12 horas de luz y oscuridad, acceso libre a una comida estándar y agua hasta 12 horas antes del comienzo del experimento, en que se les mantuvo en ayuno aunque con libre acceso al agua.

Las ratas fueron distribuidas en 3 grupos:

Grupo A. 28 animales a los que se les administró homogeneizado pancreático previamente activado con enteroquina (EK).

Grupo B. 28 animales con administración de homogeneizado pancreático sin previa activación con EK.

Grupo C. 50 animales control que recibieron suero fisiológico.

Cada grupo fue dividido en subgrupos considerando el momento del sacrificio del animal en: 0, 2, 6 y 24 horas a partir del momento de la administración de homogeneizado.

Preparación y administración del homogeneizado pancreático

Se utilizaron 8 ratas Wistar hembra. Fueron dejadas en ayuno durante 12 horas antes del sacrificio pero con libre acceso al agua. Tras la anestesia con Pentothal sódico (B. Braun Medical, Barcelona) i.p. a dosis de 25 mg, se procedió a la laparotomía y extracción del páncreas siguiendo una técnica aséptica. El tejido fue inmediatamente suspendido en una solución estéril de Tris buffer, pH 7.8, con Triton X 100. El páncreas fue homogeneizado en frío y centrifugado a una temperatura de 4 °C. Cada 20 ml del sobrenadante fue incubado durante 30 minutos a 37 °C con 2,22 ml de EK (Sigma, Londres) (5 mg/ml en tampón Tris buffer, pH 7,8) que fue utilizado en los animales del grupo A. En el grupo B el homogeneizado fue incubado sin EK.

Se comprobó la actividad tripsínica de este homogeneizado (120 UI/g proteína) para el grupo A mediante el método de Erlanger-Kokowsky-Cohen (44), que estuvo ausente en el no incubado con EK. También se observó previamente que la inyección i.p. de 1 ml de Triton X 100 al 1/1000 más 1 ml de suero fisiológico en la rata no producía ningún tipo de alteración.

Los homogeneizados fueron inyectados i.p. a dosis de 0,5 ml a cada animal, y este momento fue considerado el tiempo 0.

Tabla I. Parámetros histológicos evaluados en el páncreas y en el pulmón (valores de 0 a 3)

Páncreas	0	1	2	3
<i>Edema pancreático</i> (separación entre acinis –en μm – en un lobulillo)	Juxtapuesto	0,5-1 μm	1-1,5 μm	> 1,5 μm
<i>Infiltrado inflamatorio</i> (presencia de PMN en el intersticio por 100 acinis evaluados)	Ausencia	< 5	5-10	> 10
<i>Apoptosis</i> (n.º de acinis con imágenes de núcleos apoptoicos por 100 acinis valorados)	Ausencia	0-5	5-10	> 10
<i>Vacuolización</i> (células contenidas en 100 acinis que presentan vacuolas)	Ausencia	0-10	10-25	> 25
Pulmón				
<i>Infiltrado inflamatorio</i> (PMN en capilares alveolares, examinando 5 campos x 400 aumentos)	Ausencia	< 5	5-10	> 10
<i>Edema intersticial</i> (espesor medio –en μm – del septo alveolar de 10 campos x 400 aumentos)	< 10 μm	10-15 μm	15-20 μm	> 20 μm
<i>Hemorragia intersticial</i> : valorada de 0 a 3 según la presencia de hematíes en el intersticio				
<i>Estructura pulmonar</i> : desde 0 a 3 según el grado de desestructuración				

PMN: leucocitos polimorfonucleares.

Una vez transcurridos los distintos tiempos, los animales fueron sacrificados siguiendo un protocolo previamente establecido con exsanguinación por punción cardiaca, previa anestesia con 25 mg de Pentothal sódico inyectado i.p. Posteriormente, se realizó una toracotomía y se procedió a extraer el pulmón derecho y una laparotomía media amplia para extraer el páncreas.

Determinaciones bioquímicas y de citoquinas

La sangre obtenida mediante punción cardiaca fue mantenida en hielo durante 90 minutos hasta la formación de coágulo. Tras la centrifugación, el suero fue congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización en las determinaciones bioquímicas y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la determinación de citoquinas.

En el suero se determinaron los niveles de amilasa, lipasa, urea, creatinina, AST, ALT y glucosa utilizando un autoanalizador automático Hitachi 917. El valor del hematocrito fue determinado por centrifugación capilar utilizando sangre heparinizada.

De igual forma, el TNF α , la IL-1 β y la IL-6 fueron determinadas utilizando “kits” comerciales de ELISA para rata y para cada citoquina. Se utilizó un “kit” con una sensibilidad de 20-1000 pg/ml (Diacclone, France) para el TNF α , uno con una sensibilidad de 10-1500 pg/ml (Endogen, USA) para la IL-6 y uno con una sensibilidad entre 3-2000 pg/ml (Biosource Internacional, USA) para la IL-1 β . La lectura se efectuó con un espectrofotómetro Delta Soft versión 4.1 (Biometa-llics. Inc) con longitudes de onda de 450 nm con un ordenador Macintosh LC II.

Estudio morfológico

El pulmón derecho y el páncreas de cada animal se pesaron en fresco y fueron sumergidos en una solución de for-

maldehído al 10%, siendo posteriormente teñidos con hematoxilina/eosina. Ambos órganos fueron estudiados con un microscopio óptico (Zeiss II, Inc, New York) con 200, 400 y 1.000 aumentos. Los parámetros valorados en cada órgano fueron graduados de acuerdo a una escala de 0 a 3 como se muestra en la tabla I.

Se realizó también una evaluación de la histología pulmonar y pancreática calculando la media de un amplio número de parámetros histológicos de cada uno de estos órganos siguiendo un método ya establecido por otros autores (45,46).

La relación del peso de cada órgano en fresco con el peso corporal de cada animal fue dada en porcentaje y fue usada como una estimación del edema tisular (pulmón y páncreas).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (esm). Utilizamos un programa estadístico SPSS 6.1.2. Empleamos la U de Mann Whitney como prueba no paramétrica para la comparación de medias y tomamos una $p \leq 0,05$ como valor estadísticamente significativo.

RESULTADOS

No hubo mortalidad en ninguno de los grupos estudiados.

Niveles enzimáticos en ambos homogeneizados

Los niveles de lipasa y amilasa en el homogeneizado sin activación con EK fueron más elevados que aquellos del homogeneizado activado (lipasa 122,1 KU/ml contra 97,2 KU/ml, amilasa 298,7 U/ml contra 258,3 U/ml).

Los niveles de transaminasas también fueron más elevados en el homogeneizado sin activar con EK que en el homogeneizado activado (AST 6430 mU/ml contra 3450 mU/ml, ALT 2135 mU/ml contra 312 mU/ml).

Los resultados de la estimación de proteínas demostraron una mayor concentración en el homogeneizado sin activar con EK que en el activado (1,81 g/dl vs 1,13 g/dl).

Evaluación pancreática

No hubo alteraciones pancreáticas macroscópicas en los grupos A y B en comparación con el control, ni hubo diferencias en la relación peso pancreático/peso corporal.

Se observaron niveles de amilasa sérica significativamente más elevados a las 2 y 6 horas en el grupo B con respecto al control. La lipasa sérica mostró valores ligeramente más elevados

en ambos grupos (A y B) a las 2 y 6 horas, que fueron estadísticamente significativos con respecto al control (Tabla II).

Cuando se compararon los grupos experimentales, observamos que el grupo B tenía niveles de amilasa a las 6 horas significativamente más altos que el grupo A. Esto mismo también sucedió en relación con la lipasa en los tiempos 2 y 6 horas (Tabla II).

El estudio histológico del páncreas demostró la presencia de infiltración inflamatoria acinar y edema pancreático a las 24 horas en el grupo A (con EK), una diferencia que fue significativa en relación con el grupo control. En el grupo con homogeneizado sin EK (grupo B), se observó a las 24 horas una infiltración inflamatoria de los acini y ligera apoptosis, mientras que a las 2, 6 y 24 horas se encontró edema acinar. En todos los tiempos, estos cambios tenían significación estadística en relación con los controles y a las 2 y 24 horas con respecto al grupo A (Tabla III).

Tabla II. Resultados de los parámetros séricos, incluyendo las citoquinas en los diferentes grupos. Los resultados se expresan como media \pm SEM

Grupo	Tiempo	Amilasa mU/ml	Lipasa U/ml	AST/GOT mU/ml	ALT/GPT mU/ml	Urea mg/dl	Creatinina mg/dl	Glucosa mg/dl	Hematocrito %	IL-1 β pg/ml	TNF- α pg/ml
A	n=5 0h	1909 \pm 133	74,6 \pm 16	134 \pm 23	30 \pm 3	47,4 \pm 3	0,5 \pm 0,02	159 \pm 2,9	40 \pm 1,8	25,3 \pm 12	34 \pm 13
	n=8 2h	2721 \pm 288	111 \pm 28*	139 \pm 8,8*	27 \pm 1,6	42,9 \pm 3	0,5 \pm 0,02	139 \pm 7,8	42,4 \pm 1	75,8 \pm 31,7	35,8 \pm 6,8
	n=8 6h	2314 \pm 131	23,3 \pm 12*	143 \pm 10*	29 \pm 3	40 \pm 1	0,6 \pm 0,02*	121 \pm 8	43,8 \pm 1,5	58,8 \pm 32,5*	24,8 \pm 3,7
	n=7 24h	1241 \pm 140	49 \pm 31	143 \pm 5	33 \pm 2,2	54,3 \pm 3+	0,6 \pm 0,03	156 \pm 28	42,6 \pm 3	59,3 \pm 38	58 \pm 9
B	n=7 0h	2405 \pm 250	359 \pm 134*	120 \pm 10	26 \pm 1,8	42 \pm 2	0,6 \pm 0,01	163 \pm 8,9	44 \pm 2,4	71,2 \pm 26*	43,2 \pm 4,9
	n=7 2h	3780 \pm 197*+	479 \pm 108*+	171 \pm 15*	43 \pm 2,3*+	43 \pm 1,5	0,5 \pm 0,01	148 \pm 11	43,9 \pm 2,6	109 \pm 54	42 \pm 3,8
	n=7 6h	2056 \pm 146	123 \pm 35*+	192 \pm 31*	49 \pm 6,8*+	48 \pm 2,4*+	0,6 \pm 0,02*	113 \pm 7,8	46 \pm 1,7	22,4 \pm 7,4*	49 \pm 8
	n=7 24h	1254 \pm 78	20 \pm 9	137 \pm 11	31 \pm 1,9	37,3 \pm 2,7	0,5 \pm 0,02	124 \pm 6,7	44,6 \pm 1	30,7 \pm 11	39 \pm 6,6
C	n=11 0h	2009 \pm 128	44,7 \pm 24	146 \pm 24	38 \pm 5	44,6 \pm 1,7	0,6 \pm 0,02	127 \pm 14	43,8 \pm 1,7	25,1 \pm 18	53,4 \pm 14
	n=13 2h	2147 \pm 160	13,3 \pm 8	103 \pm 5	28 \pm 1	38,7 \pm 1	0,5 \pm 0,01	126 \pm 9	42,1 \pm 2	76 \pm 32	39,8 \pm 6
	n=13 6h	2113 \pm 131	12,5 \pm 7	118 \pm 11	30 \pm 1,9	37,1 \pm 1,7	0,5 \pm 0,01	132 \pm 11	44,8 \pm 1,6	2,1 \pm 1,4	31,2 \pm 4,8
	n=13 24h	1309 \pm 59	11,2 \pm 4,5	122 \pm 6,7	32 \pm 2	44,2 \pm 3	0,6 \pm 0,01	122 \pm 7,4	46,3 \pm 1,8	18,8 \pm 9,9	45,4 \pm 4,8

*Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con el grupo control ($p \leq 0,05$)

+Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el grupo A con el B ($p \leq 0,05$)

Grupo A: homogeneizado activado con EK; grupo B: homogeneizado no activado con EK; grupo C: control.

Tabla III. Peso e histología pancreática en los diferentes grupos. Resultados expresados como media \pm SEM

Grupo	Tiempo	Vascularización pancreática	Infiltrado inflamatorio pancreático	Edema pancreático	Apoptosis acinar	Histología pancreática (valoración global)	Peso páncreas/peso corporal
A	n=5 0h	0	0	0	0	0	0,22 \pm 0,04
	n=8 2h	0,13 \pm 0,3	0	0,13 \pm 0,3	0	0,06 \pm 0,1	0,23 \pm 0,02
	n=8 6h	0	0,13 \pm 0,1	0,13 \pm 0,3	0	0,06 \pm 0,1	0,22 \pm 0,01
	n=7 24h	0	0,29 \pm 0,4*	0	0	0,07 \pm 0,1*	0,22 \pm 0,01
B	n=7 0h	0	0	0,14 \pm 0,1	0	0,04 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02
	n=7 2h	0	0	0,71 \pm 0,1*+	0	0,18 \pm 0,05*	0,26 \pm 0,01
	n=7 6h	0,01	0	0,5 \pm 0,3*	0	0,13 \pm 0,09	0,22 \pm 0,02
	n=7 24h	0	1 \pm 0,5*	1 \pm 0,3*+	0,5 \pm 0,2*	0,63 \pm 0,2*+	0,23 \pm 0,01*
C	n=11 0h	0	0	0	0	0	0,25 \pm 0,02
	n=13 2h	0	0	0	0	0	0,22 \pm 0,01
	n=13 6h	0	0	0	0	0	0,22 \pm 0,02
	n=13 24h	0	0	0	0	0	0,17 \pm 0,01

*Diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias del grupo A con el grupo B ($p \leq 0,05$)

+Diferencia estadísticamente significativa al comparar con la media del grupo control ($p \leq 0,05$)

Grupo A: homogeneizado activado con EK; grupo B: homogeneizado no activado con EK; grupo C: control.

Transaminasas séricas y parámetros de función renal

Ambos grupos experimentales presentaron a las 2 y 6 horas niveles séricos de AST significativamente más elevados que el grupo control. En esos mismos tiempos, los niveles séricos de ALT fueron más elevados en el grupo B con respecto a las controles y en relación con el grupo A (Tabla II).

No hubo diferencias en los valores de urea sérica entre los grupos. La creatinina sérica presentó en el grupo A unos niveles significativamente más elevados que en los controles a las 6 horas. No hubo diferencias en la glucosa ni en el hematocrito (Tabla II).

Niveles séricos de IL-1 β , TNF α e IL-6 (Tabla II)

La determinación de la IL-1 β mostró niveles significativamente más elevados a las 6 horas en ambos grupos A y B comparados con el grupo control, apareciendo los valores más altos en el grupo A (58,8 pg/ml) en contraste con el grupo B (22,4 pg/ml) pero sin que las diferencias alcanzaran significación estadística. Lo mismo ocurrió a las 0 horas en el grupo B (Tabla II).

La determinación de la IL-6 no mostró cambios significativos en ningún grupo motivo por lo que no se incluyen estos datos en la tabla II.

Los resultados del TNF α tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los dos grupos experimentales entre sí o con el grupo control durante los diferentes tiempos del experimento.

Alteraciones en la histología pulmonar

En el grupo A, observamos una mayor alteración de la arquitectura a las 6 horas en comparación con el grupo control y con el grupo B, junto con una mayor presencia de edema

pulmonar a nivel alveolo-capilar en el mismo periodo. Estas diferencias eran estadísticamente significativas. En el grupo B, no se observaron alteraciones en relación con el control en ninguno de los parámetros analizados (Tabla IV, Fig. 1).

La valoración de la relación peso del pulmón derecho/peso corporal no mostró diferencias significativas entre los grupos.

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestro estudio, y como era de esperar, no observamos alteraciones estructurales pancreáticas significativas en los grupos experimentales. La presencia de un infiltrado inflamatorio muy discreto y de un mínimo edema intersticial en ambos grupos a las 24 horas podría estar relacionado con una agresión tardía al páncreas, probablemente de origen inmunológico. Se puede especular que la administración de un homogeneizado pancreático proveniente de otro animal pudiera generar una respuesta inmune contra la propia víscera. Una posibilidad más remota, sin embargo, pudiera ser que el incremento de la IL-1 β producida en ambos grupos a las 6 horas provocase una quimiotaxis de células inflamatorias selectiva y tardía sobre el páncreas. En cualquier caso, estas alteraciones son tan escasas que no parece que hayan influido ni en la afectación pulmonar ni en la producción de citoquinas, ya que estos fenómenos aparecen en fases más tempranas.

Dada la ausencia de lesión pancreática, los incrementos en la lipasa y amilasa séricas podrían ser debidos a absorción peritoneal de los enzimas contenidos en el homogeneizado administrado, hecho que también se produce en la propia ascitis pancreática (47,48). Las diferencias en los niveles de lipasa y amilasa entre los grupos A y B, más elevadas en B, concuerdan con la mayor actividad de lipasa y amilasa observada en el homogeneizado no activado con EK. Se pudiera pensar que los niveles enzimáticos menores en el ho-

Tabla IV. Peso e histología pulmonar en los diferentes grupos. Resultados expresados como media \pm SEM

Grupo	Tiempo	Infiltrado inflamatorio pulmonar	Hemorragia intersticial pulmonar	Estructura pulmonar	Edema pulmonar	Histología pulmonar (evaluación global)	Peso pulmón/peso corporal
A	n=5 0 h	0,2 \pm 0,2	0,4 \pm 0,4	0,4 \pm 0,4	0,6 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2	0,21 \pm 0,02
	n=8 2 h	0	0,38 \pm 0,1	0,75 \pm 0,3	0,75 \pm 0,3	0,47 \pm 0,1	0,27 \pm 0,05
	n=8 6 h	0,5 \pm 0,1	0,88 \pm 0,3	1,13 \pm 0,2*+	1,25 \pm 0,2*+	0,94 \pm 0,2*+	0,22 \pm 0,02
	n=7 24 h	0,14 \pm 0,1	0,14 \pm 0,1	0,29 \pm 0,1	0,43 \pm 0,2	0,25 \pm 0,1	0,43 \pm 0,1
B	n=7 0 h	0	0	0,14 \pm 0,1	0,14 \pm 0,1	0,07 \pm 0,07	0,20 \pm 0,01
	n=7 2 h	0,67 \pm 0,3+	0,17 \pm 0,1	0,17 \pm 0,1	0,5 \pm 0,3	0,38 \pm 0,1	0,20 \pm 0,01
	n=7 6 h	0,14 \pm 0,1	0,29 \pm 0,2	0,43 \pm 0,2	0,43 \pm 0,2	0,32 \pm 0,1	0,29 \pm 0,04
	n=7 24 h	0,17 \pm 0,1	0,67 \pm 0,2	0,67 \pm 0,2	0,83 \pm 0,4	0,58 \pm 0,2	0,20 \pm 0,01
C	n=11 0 h	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,26 \pm 0,03
	n=13 2 h	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,24 \pm 0,03
	n=13 6 h	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,25 \pm 0,03
	n=13 24 h	0	0,4 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1	0,22 \pm 0,04

*Diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con el grupo control ($p \leq 0,05$)

+Diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias del grupo A con el B ($p \leq 0,05$)

Grupo A: homogeneizado activado con EK; grupo B: homogeneizado no activado con EK; grupo C: control.

homogeneizado activado con EK podrían ser el resultado de la digestión por la tripsina presente en él.

Igualmente, los valores más elevados de ALT a las 2 y 6 horas en el grupo B pudieran también ser interpretados de esta misma manera. Sin embargo, varios estudios han demostrado la presencia de apoptosis de células hepáticas en animales sanos después de la administración i.p. de ascitis pancreática (42). En este sentido, el homogeneizado pancreático utilizado en nuestro estudio pudiera reproducir este mismo efecto.

La ausencia de niveles séricos detectables de IL-6 y de diferencias significativas en los valores de TNF α pudieran explicarse por el hecho de que las lesiones producidas no fueran de suficiente intensidad, como ya ha sido puesto de relieve en otros trabajos experimentales o en humanos (39,49,50).

Los niveles de IL-1 β a las 6 horas permanecieron significativamente más altos en ambos grupos de animales en relación con el grupo control. Como el homogeneizado pancreático provenía de ratas sanas, sin inflamación pancreática, no parece ser este el origen de la citoquina. Aunque nosotros no hemos estudiado histológicamente el peritoneo, se han publicado estudios que usan modelos similares al nuestro en los que no pudieron detectar la presencia de signos inflamatorios peritoneales (31). Por ello, podemos pensar que la elevación de IL-1 β en los grupos A y B no era debida a la presencia de una inflamación peritoneal. Tampoco parece que el páncreas o el pulmón sean el origen probable de esta citoquina ya que no existe lesión en estos órganos previa al incremento de la IL-1 β . Así pues, sugerimos que el origen más probable de esta citoquina pudiera encontrarse en los macrófagos intraperitoneales. Numerosos trabajos han demostrado la producción de citoquinas pro-inflamatorias y un aumento de proteínas reguladoras de la transcripción de genes pro-inflamatorios, tales como NF κ B por los macrófagos peritoneales y esplénicos tras ser estimulados con ascitis pancreática carente de endotoxinas y desprovista de citoquinas (15,18-20,28-33).

Si tenemos en cuenta que los enzimas pancreáticos liberados a la circulación no parecen influir sobre la producción de citoquinas por los macrófagos (19,20), ha de existir un factor de origen pancreático presente en el homogeneizado, no dependiente de la existencia de una lesión pancreática previa, que actúe sobre los macrófagos peritoneales y los estimule a producir IL-1 β .

El hecho de que en el grupo A los niveles de IL-1 β a las 6 horas sea mayor que en el grupo B, y que sólo en el grupo A se hayan producido lesiones pulmonares significativas sugiere que este factor desconocido se encuentre en mayor cantidad en el homogeneizado activado (¿un producto de la transformación por los enzimas activados de alguna proteína

pancreática?). Otra posibilidad pudiera ser que la presencia de enzimas activados contribuya al efecto de este factor sobre los macrófagos peritoneales, y aunque parece que los enzimas no son directamente responsables de estos fenómenos, es probable que los favorezcan (18,20,21,23).

En cuanto al estudio de la morfología pulmonar, en el grupo A, se apreciaron alteraciones en la estructura pulmonar normal y la presencia de un mínimo edema pulmonar, estadísticamente significativo a las 6 horas en comparación con los grupos B y C. La ausencia de diferencias en el peso del pulmón puede ser debida al bajo grado de edema con ausencia de hallazgos macroscópicos junto con un error de muestreo, ya que el pulmón derecho extirpado a los animales no tenían exactamente del mismo tamaño en todos los animales, y no siempre existe un claro paralelismo entre el tamaño pulmonar y el peso corporal.

Es difícil establecer el papel que los enzimas activados del homogeneizado pancreático pudieran haber jugado en la generación de las lesiones pulmonares. Un reciente estudio ha demostrado una mayor lesión pulmonar asociada a PA cuando se administra EK intravenosa con el fin de activar los enzimas pancreáticos que se encuentren fuera de los acinis. Sin embargo, este procedimiento suele causar un agravamiento de la lesión pancreática, por lo que el incremento de la lesión pulmonar debe atribuirse más a la severidad de la PA que a la propia actividad de las enzimas pancreáticas sobre el pulmón (51). Teniendo en cuenta que los enzimas activados por sí solos no provocan lesión pulmonar (18) y que tanto en la PA como en otras enfermedades es patente la estrecha relación existente entre la presencia de citoquinas pro-inflamatorias y la aparición de lesión pulmonar (52-55,56), pudiéramos relacionar las alteraciones pulmonares presentes en el grupo A con los niveles más elevados de IL-1 β en sangre que vemos en nuestros animales. No obstante, a las 2 horas, la IL-1 β está más elevada en el grupo B que en el grupo A, aunque esta diferencia no es significativa, lo cual hace dudar del papel exclusivo de la IL-1 β en la producción de las lesiones pulmonares. En este sentido, pudiera haber algún otro factor presente en el homogeneizado activado por EK que contribuya a la aparición de esas lesiones.

En conclusión, el hecho de que sólo se observaran lesiones pulmonares en animales tratados con homogeneizado activado donde los niveles de IL-1 β estuvieron significativamente más elevados en relación con el control sugiere que los enzimas pancreáticos pudieran ser posibles facilitadores de una interacción entre el homogeneizado activado y los macrófagos peritoneales. En el caso de una verdadera ascitis pancreática, todos estos elementos junto con la inflamación pancreática, podrían converger generando, indudablemente, mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias y alteraciones sistémicas.