

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Medicina

Unidad I+D Asociada al CNB-CSIC

Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología

**ANÁLISIS DEL COMPROMISO DEL SISTEMA
INMUNE EN LA PANCREATITIS AGUDA**



M^a Esther San Antonio Sánchez

TESIS DOCTORAL

2006

Director

Prof. Dr. Melchor Álvarez de Mon Soto

Catedrático de Medicina y

Director del Departamento de Medicina

Unidad I+D Asociada al CSIC

Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología

Co-directores

Prof. Dr. Luis Manzano Espinosa

Profesor Titular de Medicina

Departamento de Medicina

Unidad I+D asociada al CSIC

Dr. Jorge Monserrat Sanz

Profesor Asociado de Inmunología

Departamento de Medicina

Unidad I+D asociada al CSIC

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral, desarrollada durante ocho largos años, no habría comenzado, avanzado y finalizado sin la inestimable colaboración de profesores, investigadores, compañeros, amigos y familiares que, día a día, pusieron a mi disposición sus conocimientos, experiencia, paciencia y cariño.

En primer lugar debo agradecer al **Profesor Álvarez de Mon**, Catedrático Jefe del Departamento de Medicina, la oportunidad de formar parte de su equipo investigador gracias a la concesión de becas predoctorales, la disponibilidad de las más modernas técnicas de citometría y su dedicación personal a la corrección de este manuscrito. También quiero dar las gracias a los profesores de Inmunología, **Dr. Antonio de la Hera**, por abrirme las puertas del fascinante mundo de la Inmunología y hacer que valiera la pena un “arriesgado” cambio de Plan Estudios; al **Dr. Eduardo Reyes** por sus invaluable “lecciones de diplomacia”, impartidas en amenas Tertulias de Desayuno; y al **Dr. Alfredo Prieto** por dedicarme su tiempo y conocimientos en mis primeros pasos en el Laboratorio. Por último quiero expresar mi reconocimiento a los co-directores de esta Tesis, el **Dr. Luis Manzano**, por su dedicación personal a este proyecto, su esfuerzo diario en el difícil cometido de motivar a los clínicos, y su inagotable paciencia cuando mi testarudez hacía su aparición; y el **Dr. Jorge Monserrat**, por todas esas pequeñas cosas que no siempre apreciamos pero sin las cuales ni el trabajo de laboratorio ni el procesamiento de datos podrían llevarse a cabo.

Por supuesto, y tratándose de un proyecto clínico, no podría olvidarme de los médicos y enfermeras que hicieron posible la obtención de las muestras necesarias para asegurar la calidad del trabajo científico. Por ello, expreso mi agradecimiento al *Dr. Juan Carlos Leal*, del Servicio de Gastroenterología, al *Dr. Raul de Pablos*, de la Unidad de Cuidados Intensivos, y a las *anónimas enfermeras* del Hospital Universitario Príncipe de Asturias por su impecable trabajo y su trato amable.

Los comienzos en un sitio nuevo siempre son difíciles pero yo tuve la suerte de tener a mi lado a una gran persona, y actualmente una de mis mejores amigas, cuyo coraje y tesón a la hora de superar todas las dificultades son un ejemplo a seguir, mi más sincero agradecimiento y cariño a la **Dra. Noemí Alfaro** por su apoyo y consejo dentro y fuera del Laboratorio, y porque, a diferencia de mí, nunca tuvo dudas sobre la finalización de esta etapa.

Durante estos años he aprendido y madurado como investigadora y persona, y en esos cambios han influido muchas personas. Un puesto de honor en este difícil camino lo ocupa **Ana Belén Mallo**, Técnico de Laboratorio y “casi Doctora” por derecho propio, por estar a mi lado en cada paso, por todos esos cafés en los buenos, malos y peores tiempos, por apoyarme sin juzgarme, y por *darme la lata* cuando pierdo los ánimos. También he compartido buenos momentos con las **Dras. Leticia Muñoz** y **Mónica Nieto**, que junto con el Técnico de Laboratorio **Miguel Ángel Alcázar**, inauguraron

el *rat team*, y nos *chanaron* a todos por los cuatro costados con su generosidad y buen humor; con la **Dra. “Espe” Perucha**, inagotable investigadora, inconformista, luchadora y sobretodo buena amiga; con el profesor **David Díaz**, prototipo de científico *pasota* pero prolífico con una risa inconfundible; y con **Hugo Barcenilla**, un genio disfrazado de loco capaz de hacer reír a las piedras.

Una mención especial merecen las amigas que, por diversos motivos no se quedaron pero que dejaron huella. La **Dra. Esther Díaz**, magnífica investigadora desperdiciada en tareas menores, que me abrió los ojos cuando más lo necesitaba demostrándome que nunca es tarde para cambiar; **Virginia Valero**, farmacéutica granadina con un salero que te alegraba el día, espíritu reivindicativo y, pese a quien pese, unos 40 años muy bien llevados; **Verónica Sualdea**, otra buena investigadora ignorada, a quien tuve el placer de transmitir todos mis conocimientos y con la que compartí muchas *charlas-terapia post-reunión*; y **Paz Prieto**, un espíritu inquieto siempre dispuesto a escuchar, que se hace querer desde el primer momento y cuya generosidad y bondad no tiene límite. Pero, si unas se van otras llegan, mi agradecimiento también a **Sonia Mur** y **Ángela Hernández** con las que he tenido y tengo la fortuna de trabajar, que me han tolerado y toleran como Jefa novel, y cuyo carácter esta sentando un precedente en un ambiente hasta entonces relativamente sumiso.

También reservo un apartado exclusivo para todas aquellas compañeras (y algún compañero) latinoamericanas que llegaron allende los mares para enriquecer mi limitada existencia con su cultura, su riqueza lingüística y su gastronomía. Mi agradecimiento y cariño a **Consuelo Fonfría**, la argentina más gallega que he tenido la suerte de conocer, a quien admiro profundamente por su resolución ante las dificultades y con cuyo apoyo atravesé una etapa crucial en mi visión de la investigación ganando una gran amiga en el proceso. Todo el cariño, apoyo y ánimo que pueda darles en unos momentos difíciles a dos maravillosas doctoras, la **Dra. Inés Rodríguez** de Uruguay, la persona más buena y dulce que conozco, incansable en su trabajo pero siempre dispuesta a ayudar a otros; y la **Dra. Elisa D’Angello** de Venezuela, la antítesis de la “calma sudamericana” que no se rinde jamás, con el fuerte carácter italiano y las ideas muy claras. Mi agradecimiento a la **Dra. Rosario Hernández** de Nicaragua, magnífica médico todo dulzura y sosiego, que vino para investigar pero, por suerte para los pacientes del Hospital General de Guadalajara, se quedó para ejercer; y a la **Dra. Marlene Matías** de Perú, una viajera infatigable y ejemplo a seguir, capaz de poner en jaque a la cúpula mayor sin retroceder un ápice y sacar su Tesis contra viento y marea. Por ultimo, un cariñoso abrazo para la **Dra. Guadalupe** de Méjico, con su risa contagiosa y su alegría de vivir se abrió camino hacia el Sur dejando atrás los malos momentos y algunas buenas amigas.

Por supuesto, no puedo dejar de incluir en estos agradecimientos a mis amigos de toda la vida que me escucharon y me animaron cuando más lo necesitaba. Mil gracias para **Rosa**, una amiga de las de siempre aunque ahora ya no estemos en contacto, seguimos caminos muy diferentes pero nunca

dejamos de ayudarnos y comprendernos en los buenos y malos momentos; todo mi cariño para mis amigas del instituto, **Ana**, con quien compartí mil confidencias de adolescente, buenisimos veranos y divertidísimos momentos familiares, y **Loli**, el mejor ejemplo del refrán “*quien tiene un amigo tiene un tesoro*”, que me soporta con infinita paciencia y me perdona todos mis olvidos; un lugar privilegiado para **Mónica**, la Universidad no hubiera sido lo mismo sin ella, quién podría olvidar las charlas interminables sobre mil millones de cosas y las discusiones bizantinas sobre *La Guerra de las Galaxias*, gracias de todo corazón por estar siempre allí aunque a veces no lo sepa apreciar, y por asumir “el tostón” de revisar este manuscrito. También tengo un huequito para los chicos, **Fernando**, que pasó de ser el novio de una amiga a ser un buen amigo con quien compartir tanto charlas intelectuales como bromas intrascendentes llenas de buen humor; **Iván**, cinéfilo, bibliófilo y coleccionista empedernido, siempre dispuesto a ir donde haga falta, gracias por las mil anécdotas, las tardes-noches de cine y cena, y por aguantar todas mis rarezas; y como no, gracias a **Jesús**, mi amigo más polifacético, empezó siendo el primo de una amiga, no tardó en convertirse en uno de mis mejores amigos, y para su “*inmensa suerte*” ahora es, además, mi cuñado, ¿qué puedo decir excepto “*Bienvenido a la familia*”?

Ahora que llegamos al final, dedico un apartado propio a una persona difícil de catalogar, **Javier Serrano**, mi amigo y mi pareja, mi “*Pepito Grillo*” particular, a quien quiero muchísimo aunque a veces me saque de mis casillas, que se esfuerza infatigablemente en ampliar mis horizontes culturales, me ayuda a ver el lado bueno de las cosas, y siempre me presta un oído para escuchar y un hombro para llorar. Su colaboración en este trabajo no es sólo espiritual, a él tengo que agradecerle todos los dibujos presentes en este manuscrito.

Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias de todo corazón a mis padres, **Jesús y Concepción**, ellos tienen todo el mérito de cada uno de mis logros en la vida, por darme todas las oportunidades de las que ellos carecieron, por apoyar todas mis decisiones aunque no siempre estuvieran de acuerdo, y por saber esperar con paciencia este importante evento y otros que sin duda vendrán. Y, por supuesto, no podía faltar en estos agradecimientos, mi hermana **Elena**, desde que tengo uso de razón siempre ha estado allí, es mi mejor amiga y mi confidente, no puedo imaginar ni un solo momento de mi vida, desde el más importante al más nimio, sin ella; así pues, “*gracias por todo hermanita*”. También quiero recordar en estos momentos a una persona muy importante en mi vida, que fue una segunda madre para mí y a la que echo mucho de menos, todo mi cariño este donde este para mi abuela **Victoria**.

Índice

	n° página
ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	20
1. ASPECTOS CLÍNICOS	21
1.1. Etiopatogenia	22
1.1.1. Litiasis biliar	24
1.1.2. Alcohol	25
1.1.3. Alteraciones metabólicas	25
1.1.4. Trauma e isquemia	25
1.1.5. Fármacos	25
1.1.6. Infecciones	26
1.1.7. Autoinmune	26
1.1.8. Idiopática	27
1.2. Diagnóstico	27
1.3. Clasificación de la Pancreatitis aguda. Criterios de gravedad	29
1.4. Marcadores predictivos	32
1.4.1. Marcadores de inflamación	33
1.4.2. Marcadores de activación del tripsinógeno	34
1.4.3. Marcadores de liberación de enzimas pancreáticas	36
1.5. Diagnóstico etiológico	38
1.5.1. Patología biliar	38
1.5.2. Patología grave infectada	40
1.6. Pancreatitis aguda y shock	41
1.6.1. El shock en la pancreatitis aguda grave o necrotizante	41
1.6.2. Características hemodinámicas de la pancreatitis aguda	42
1.6.3. Patogénesis del shock en la pancreatitis aguda	43
1.6.4. Shock pancreático y su patogénesis	43
1.7. Tratamiento	44
1.7.1. Asistencia nutricional en pancreatitis aguda	45
1.7.2. Analgesia	45

	n° página
1.7.3. Profilaxis antibiótica en pancreatitis aguda grave	46
1.7.4. Otras medidas en el manejo de la pancreatitis aguda grave no infectada	47
1.7.5. Tratamiento de la patología biliar	47
1.7.6. Pancreatitis aguda post-ERCP	48
1.7.7. Tratamiento de la infección pancreática	48
1.7.8. Terapias de utilidad potencial en pancreatitis aguda	50
2. SISTEMA INMUNE	53
2.1. Sistema principal de histocompatibilidad (MHC)	54
2.2. Componentes celulares del sistema inmune	56
2.2.1. Linfocitos T	56
2.2.2. Linfocitos B	57
2.2.3. Células NK	59
2.2.4. Células presentadoras de antígeno (APCs)	61
2.3. Recirculación y activación linfocitaria	63
2.3.1. Moléculas de adhesión. Selectinas e integrinas	67
2.3.2. Quimioquinas y quimiorreceptores	73
2.3.3. Expresión secuencial de quimiorreceptores (multistep navigation) en el desarrollo, maduración, recirculación y activación de componentes del SI	83
2.3.4. Moléculas coestimuladoras	84
2.3.5. Marcadores de activación	86
2.4 Componentes moleculares del sistema inmune	91
2.4.1. Citoquinas	91
2.4.2. Complemento	102
3. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS	104
3.1. Durante el episodio de PA se producen alteraciones en el número de células, distribución, y activación de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica y tejidos, relacionadas con la patogénesis y la gravedad de la enfermedad	104

	n° página
3.1.1. Disminución de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes y modelos experimentales murinos, mayor relación de la subpoblación CD4+ con la gravedad de la PA.	105
3.1.2. Los linfocitos T de pacientes con PA muestran alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de activación (CD25, CD69 y HLA-DR) durante el brote inflamatorio	106
3.1.3. Los monocitos de pacientes con PA muestran una disminución en los niveles de expresión de HLA-DR, con diferencias en función de la gravedad de la enfermedad y el desarrollo de complicaciones.	106
3.1.4. Incremento de los niveles de expresión de CD11b en monocitos y neutrófilos, y de su ligando ICAM-1 en páncreas y pulmón, durante el brote de PA. Reducción de la gravedad de la enfermedad y del daño sistémico mediante terapia con anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1.	107
3.2. Implicación de las quimioquinas y quimiorreceptores en la infiltración de leucocitos en el páncreas y órganos periféricos durante el episodio de PA, y su posible relación con la gravedad de la enfermedad	109
3.2.1. Durante el episodio de PA aumentan los niveles de quimioquinas en sangre, líquido ascítico y tejidos. El incremento es mayor en pacientes con PAG y para ciertas quimioquinas (MCP-1, IL8, GRO α y ENA-78) tiene valor predictivo en el desarrollo de complicaciones y fallo orgánico	110
3.2.2. La regulación de la expresión de quimiorreceptores podría constituir una futura terapia en la reducción del daño pancreático y la supresión de complicaciones asociadas a mal pronóstico durante la PA	111
3.3. La alteración del balance de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias es uno de los principales factores desencadenantes del proceso inflamatorio asociado a la PA y condiciona el desarrollo de complicaciones sistémicas que derivan en la forma grave de la enfermedad	111
3.3.1. La fase inicial de la PA se caracteriza por un aumento de citoquinas séricas y tisulares, el incremento de los niveles se asocia con el desarrollo de complicaciones locales y sistémicas, y tiene valor predictivo de gravedad diagnóstico y pronóstico.	112

	n° página
3.3.2. La inmonomodulación en modelos experimentales tiene efectos beneficiosos en la reducción del daño local y sistémico, y constituye la base de futuras terapias en la prevención y tratamiento de la PA.	115
3.4. La apoptosis en la PA contribuye a la eliminación del tejido pancreático dañado sin generar efectos inflamatorios	116
3.5. Efectos del metabolismo del óxido nítrico en la gravedad de la PA	117
OBJETIVOS	119
MATERIALES Y MÉTODOS	121
1. Población objeto de estudio	122
1.1. Pacientes con Pancreatitis aguda	122
1.1.1. Criterios de inclusión y estratificación	122
1.1.2. Criterios de exclusión	122
1.2. Controles	123
2. Protocolo clínico	123
3. Materiales	124
4. Obtención de muestras biológicas	126
5. Recuento y estudio de viabilidad	126
6. Estudios inmunofenotípico y funcionales	127
7. Análisis fenotípico de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo semicuantitativa (FACScalibur)	130
7.1. Marcaje con AcMo	130
7.2. Adquisición y análisis	130
8. Estudios funcionales mediante citometría de flujo semicuantitativa (FACScalibur)	132
8.1. Condiciones generales de cultivo	132
8.2. Expresión de citoquinas intracelulares en linfocitos T	132
8.3. Muerte celular programada (apoptosis) en linfocitos T	133
9. Estudio de la capacidad fagocítica y generación de radicales libres de óxido nítrico (NO) en monocitos mediante citometría de flujo semicuantitativa (FACScalibur)	134

	n° página
10. Análisis estadístico	135
RESULTADOS	136
1. Datos clínicos y analíticos	137
2. Estudio de las principales poblaciones linfocitarias y subpoblaciones de linfocitos T	140
2.1. Alteraciones en el número y la distribución de las poblaciones linfocitarias	140
2.2. Inversión de la distribución normal y disminución del número de células en las subpoblaciones de linfocitos T, CD3+CD4+ y CD3+CD8+.	143
3. Estudio de las poblaciones naïve y memoria/efectora en linfocitos T.	144
3.1. Predominancia de la subpoblación memoria/efectora sobre la naïve en linfocitos T CD4+ y CD8+.	144
3.2. Disminución del número absoluto de linfocitos T CD4+ y CD8+ naïve y memoria/efectores y valores superiores en PAL respecto a PAG.	146
4. Moléculas coestimuladoras en linfocitos T	147
4.1. Disminución de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4+ y CD8+, y marcada linfopenia de linfocitos CD4+CD28+ y CD8+CD28+ en ambos grupos de pacientes y de linfocitos CD8+CD28- en pacientes con PAL.	147
4.2. Incremento de la expresión de CD152 en linfocitos T CD4+ y modulación de la expresión en linfocitos T CD8+ en función de la gravedad de la enfermedad.	148
4.3. Incremento de la expresión de CD154 en linfocitos T CD3+ sin modulación durante la evolución del brote.	148
5. Marcadores de activación en linfocitos T y linfocitos B	150
5.1. Incremento de la expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ y disminución del número de linfocitos T CD4+CD25+, CD4+CD122+, CD4+CD71+ y CD4+CD69+.	150
5.2. Aumento del porcentaje y el número de linfocitos T CD8+CD25+, CD8+CD69+ y CD8+CD71+ en linfocitos T CD8+ en PAL respecto a PAG	151
5.3. Incremento de la expresión de CD56 por linfocitos T CD3+ y aumento del número de linfocitos T CD3+CD56+ en PAL respecto a PAG.	154

	n° página
5.4. Incremento de la molécula MHC II (HLA-DR) en linfocitos T y aumento del número de linfocitos T CD3+HLA-DR+ en PAL respecto a PAG. Linfopenia de linfocitos B CD19+HLA-DR+.	155
5.5. Disminución del porcentaje y número de linfocitos T CD3+CD38+ y linfocitos B CD19+CD38+.	156
5.6. Incremento del porcentaje y número de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan FasL (CD95) en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL.	158
6. Moléculas de adhesión en linfocitos T y linfocitos B	159
6.1. Redistribución de las subpoblaciones de linfocitos CD3+CD11a+ y marcada linfopenia de linfocitos CD3+CD11a ^{low} .	159
6.2. Disminución de la expresión de CD11a en linfocitos B CD19+ con la evolución del brote, y grave linfopenia de linfocitos CD19+CD11a+.	161
6.3. Incremento de la expresión de CD11b+ en linfocitos T CD3+ y disminución de linfocitos CD3+CD11b+ en pacientes con PAG. Disminución de la expresión de CD11b en linfocitos B CD19+ y marcada linfopenia de linfocitos CD19+CD11b+.	162
7. Expresión de quimiorreceptores en las principales poblaciones linfocitarias. Estudio de las posibles variaciones en los niveles de expresión en relación con el grado de activación en linfocitos T y linfocitos B.	164
7.1. Incremento de la expresión de quimiorreceptores (CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR4) en linfocitos T CD3+, linfocitos B CD19+ y células NK CD3-CD56+, y diferencias en el número de linfocitos en función del quimiorreceptor expresado y la gravedad de la pancreatitis.	164
7.2. Incremento de la expresión de QRs en linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+, y aumento del número de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ que expresan QRs en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG.	168
7.3. Alteraciones en la expresión de QRs en subpoblaciones de linfocitos T y B relacionadas con la función y el grado de activación.	170
8. Citoquinas intracelulares en linfocitos T	181

	n° página
8.1. Incremento generalizado de la producción de citoquinas intracelulares en linfocitos T naïve CD3+CD45RA+, pero únicamente de IL4 e IL6 en linfocitos T memoria/ efectores CD3+CD45RO+.	181
8.2. Aumento de IL4 e IL6, y disminución de IL10 e IFN γ en linfocitos CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+ de pacientes con PAL, y disminución de citoquinas intracelulares en linfocitos CD8+CD45RO+ de pacientes con PAG.	184
9. Apoptosis en linfocitos T	188
9.1. Aumento de la apoptosis espontánea en linfocitos CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ y resistencia a la inducción de apoptosis en linfocitos CD3+CD45RO+.	188
10. Estudio fenotípico y funcional de monocitos	193
10.1. Incremento de CD80, CD40, HLA-DR y CD62L en monocitos de pacientes con PAL y disminución de HLA-DR en monocitos de pacientes con PAG. Niveles de expresión significativamente superiores en pacientes leves respecto a graves.	193
10.2. Incremento de la expresión de CCR2, CCR6, CXCR3 y CXCR4 en monocitos CD14+. Incremento del número de monocitos que expresan QRs en pacientes con PAG.	196
10.3. Disminución de IL6, TNF α e IL1 β , en pacientes con PAG en ausencia de estimulación y en pacientes con PAL y PAG tras estimulación con pma+ionomicina. Incremento de la expresión de citoquinas intracelulares en pacientes leves respecto a graves.	198
10.4. Disminución de la capacidad fagocítica y de generación de radicales libres de óxido nítrico en pacientes con PAL y PAG e incremento de ambos parámetros en pacientes leves respecto a graves.	200
DISCUSIÓN	203
1. Introducción	204
2. Análisis de la distribución y estado funcional de las poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda	204
3. Análisis de la expresión de moléculas relacionadas con el tráfico linfocitario en linfocitos de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda	209

	n° página
4. Análisis de la expresión de citoquinas intracelulares en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda	214
5. Análisis de la apoptosis en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda	215
6. Análisis fenotípico y funcional de monocitos de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda	216
CONCLUSIONES	220
BIBLIOGRAFÍA	223
ANEXO I (Summary)	251

ABREVIATURAS

A		C	
7-AAD	7-aminoactinomycin D (7 aminoactinomicina D)	CAPAP	péptido de activación de la carboxipeptidasa
AcMo/ac. mo.	anticuerpo monoclonal	CD	cluster of differentiation
ADCC	citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos	CD	célula dendrítica
ADN	ácido desoxiribonucleico	CG	centros germinales
Ag/Ags	antígeno/s	CIM	concentración inhibitoria mínima
AI	apoptosis index (índice de apoptosis)	CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant (quimioattractante de neutrófilos inducido por citoquinas)
ALP	alanina proteasa	CMSP	células mononucleares de sangre periférica
ALT	alanina transaminasa	cNOS	óxido nítrico sintasa constitutiva
AML	acute myeloblastic leukemia (leucemia mieloide aguda)	CRP	proteína C reactiva
APACHE	acute physiology and chronic health evaluation	CS	control sano
APAF-1	apoptosis protease activating factor 1	CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
APC	antigen presenting cell (célula presentadora de antígeno)	D	
APC	allophycocyanin (aloficocianina)	DC/DCs	dendritic cell/s (células dendrítica/s)
AR	apoptotic rate (ratio de apoptosis)	DDM	doublet-discriminator module (discriminador de dobletes)
ARDS	adult respiratory distress syndrome	E	
SDRA	síndrome de disfunción respiratoria aguda	EAE	experimental allergic encephalomyelitis (encefalomielitis alérgica experimental)
ARN	ácido ribonucleico	EE	esfinterotomía endoscópica
ARNm	ácido ribonucleico mensajero	ERCP	endoscopy retrograde cholangiopancreatography (colangiopancreatografía retrógrada endoscópica)
AST	aspartato transaminasa	ESL-1	ligando 1 de E-selectina
B		F	
BCR	B cell receptor (receptor de células B)	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
BID	Bcl-2 interacting domain	FADD	Fas-associated death domain protein

FDCs	follicular dendritic cells (células dendríticas foliculares)	iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
FITC	fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína)	IP-10	interferon gamma inducible 10-Kd protein (proteína de 10Kd inducida por interferon gamma)
FSC	Forwars scatter	IRAK	IL-1 receptor associated kinases
G		I-TAC	interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (quimioattractante para células T alfa inducido por interferón)
GALT	gut associated lymphoid tissues (tejido linfoide asociado a tubo digestivo)	K	
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos	Kd	Kilodalton
GlyCAM-1	molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1	KIR	killer cell Ig-like receptor (receptor de la familia de las inmunoglobulinas)
GM-CSF	factor estimulador de colonias granulocito macrófago	L	
GRO	growth related oncogene	LFA	antígeno leucitario común
H		LFT	liver function test (test de función del hígado)
H^a	Historia	LGL	linfocitos grandes granulares
HEV	high endothelial venule (véculas de endotelio alto)	LLC-B	leucemia linfática crónica de células B
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana	LPS	lipopolisacárido
HLA	high large antigen	LTA	ácido lipoteicoico
I		M	
ICAM	molécula de adhesión intracelular	Mac-1	antígeno de macrófagos 1
iDC	immature dendritic cell (célula dendrítica inmadura)	MadCAM	adhesina de mucosa-molécula de adhesión
IFN	interferon	MALT	mucosal associated lymphoid tissue (tejido linfoide asociado a mucosa)
Igs	inmunoglobulinas	MAP	mitogen-activated protein
IL	interleuquina	MAPK	mitogen-activated protein kinase
ILxR	receptor de interleuquina x	MB-Lectina	lecitina de unión manano
IL1RA	antagonista del receptor de IL1	MCP	monocyte chemotactic protein (proteína quimiotáctica de monocitos)
IL1RAcP	IL-1 receptor accessory protein (proteína accesoria del receptor de IL1)	Met- RANTES	RANTES metilado

mIg	inmunoglobulina de membrana	PerCp	peridinin-chlorophyll-protein complex
Mig	monokine induced by interferon gamma (monocina inducida por interferon gamma)	PHA	phytohemagglutinin (fitohemaglutinina)
MIP	macrophage inflammatory protein (proteína inflamatoria de monocitos)	PI	propidium iodide (ioduro de propidio)
mfi	intensidad media de fluorescencia	PMA	acetato 12-forbol 13-miristato
MHC	major histocompatibility complex (complejo mayor de histocompatibilidad)	PNAd	adhesina de nódulo periférico
MIF	migration inhibitory factor (factor inhibidor de migración)	PSLG-1	glicoproteína ligando 1 de P-selectina
MPO	mieloperoxidasa	PSTI	inhibidor de la tripsina pancreática secretada
MyD88	myeloid differentiation factor 88		Q
	N	QR/QRs	quimiorreceptor/es
NAIDs	drogas anti-inflamatorias no esteroideas		R
NGF	factor de crecimiento neuronal		regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (regulador de la activación de las células T normalmente secretadas y expresadas)
NGFR	receptor del factor de crecimiento neuronal	RANTES	
NK	natural killer	rhanexina	anexina recombinante humana
NO	nitric oxide (óxido nítrico)	rhuIL4R	receptor soluble recombinante de IL4
NOS	óxido nítrico sintasa	RNI	reactive nitrogen intermediates (forma reactiva del nitrógeno)
	P	ROS	especies reactivas del oxígeno
PA	pancreatitis aguda	Rx	radiografía
PAAF	pancreatitis associated ascitic fluid (líquido ascítico asociado a pancreatitis)		S
PAF	platelet activating factor (factor activador plaquetario)	SDF	stromal cell-derived factor (factor derivado de célula estromal)
PAG	pancreatitis aguda grave	SDRA	síndrome de disfunción respiratoria aguda
PAL	pancreatitis aguda leve	SI	sistema inmune
PBS	phosphate buffered saline (tampón fosfato)	sIL6R	receptor soluble de interleucina 6
PE	phycoeritrin (ficoeritrina)		

SIRS	systemic inflammatory response (síndrome de respuesta inmunosistémica)		V
SNC	sistema nerviosos central	VCAM	molécula de adhesión celular vascular
SPINK1	inhibidor de la serin-proteasa Kazal tipo 1	VLA-4	antígeno muy tardío-4
SSC	side scatter		
SSF	suero salino fisiológico		
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6		
sTNFR	receptor del factor de necrosis tumoral soluble		

T

TAC	tomografía axial computerizada
TAP	péptido de activación del tripsinógeno
T_{CM}	Linfocitos T memoria centrales
TCR	T cell receptor (receptor de células T)
T_{EM}	Linfocitos T memoria efectores
TGF	factor de crecimiento tumoral
Th	T helper (linfocito T colaborador)
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
TLR	Toll receptor
TNF	factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
T_R/Treg	linfocitos T reguladores
TRADD	TNFR1 associated death domain protein

U

UCI	unidad de cuidados intensivos
USS	ultrasound scanning (técnicas de imagen por ultrasonido)
UTI	urinary trypsinogen inhibitor (inhibidor del tripsinógeno urinario)

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS CLÍNICOS

La **Pancreatitis aguda (PA)** es una enfermedad inflamatoria de rápida evolución, localizada inicialmente en la glándula pancreática, con expresión biológica sistémica de magnitud y gravedad variables. Constituye un problema médico de gran relevancia sociosanitaria por su considerable frecuencia y la elevada morbimortalidad que conlleva. Se estima que en España se diagnostican alrededor de 15.000 casos al año, con una mortalidad global del 10-15%.

Desde un punto de vista clínico-patológico, e independientemente del factor etiológico desencadenante, se distinguen dos formas evolutivas de PA que reflejan la intensidad de la respuesta biológica:

- Pancreatitis aguda leve (PAL): presente en aproximadamente el 80% de los casos, es un proceso autolimitado de pronóstico favorable, caracterizado por una afectación inflamatoria pancreática con escasa repercusión sistémica, cuya expresión morfológica predominante es el edema intersticial del tejido pancreático.
- Pancreatitis aguda grave (PAG): se define por la presencia de una intensa respuesta inflamatoria local y sistémica, que conlleva la aparición precoz de necrosis pancreática junto con disfunción de otros territorios orgánicos, y el desarrollo posterior de complicaciones infecciosas. La tasa de mortalidad de este grupo oscila entre el 30-40% de los casos (1, 2). Pese a que sólo el 20% de los casos cumple con los criterios de gravedad, el 95% de las muertes producidas por pancreatitis proviene de este grupo.

La mortalidad por Pancreatitis aguda presenta dos picos:

- *mortalidad precoz*: tiene lugar dentro de los primeros 6 días desde el ingreso debido a la respuesta inflamatoria sistémica (shock y fallo multiorgánico) desencadenada por la circulación de enzimas pancreáticas y mediadores activados de inflamación (citoquinas, interleuquinas, prostaglandinas,...).
- *mortalidad tardía*: tiene lugar en periodos superiores a la primera semana de ingreso como consecuencia de complicaciones locales, infección de la necrosis o de las colecciones pancreáticas, seguido de neumonía y sepsis. La principal causa de la muerte es la infección, especialmente necrosis pancreática infectada, aunque también los pacientes de edad avanzada con patologías preexistentes tienen alta mortalidad por

otras causas. La mortalidad en pacientes sin necrosis es prácticamente del 0%, en pacientes con necrosis estéril del 0-7% (3), mientras que en necrosis infectada alcanza el 40% (4).

1.1. Etiopatogenia

El páncreas normalmente secreta una gran cantidad de enzimas, entre ellas la tripsina, la quimotripsina, las amilasas, las lipasas, las elastasas, la carboxipeptidasa A y B, etc. La gran mayoría de ellas son enzimas líticas secretadas en forma de precursores inactivos (zimógenos), los cuales junto con los inhibidores enzimáticos presentes en el jugo pancreático, protegen al páncreas de su autodigestión. Los zimógenos (tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa, procarboxipeptidasa A y B y profosfolipasa A₂) son sintetizados en el retículo endoplásmico de las células acinares, almacenados dentro de gránulos de secreción y exocitados al lumen acinar para ser liberados al duodeno a través del sistema de conductos del páncreas. El principal precursor enzimático es el *tripsinógeno*, su conversión en tripsina activa se realiza en el duodeno mediante la hidrólisis enzimática por enterocinasas intestinales liberando un péptido llamado *péptido de activación del tripsinógeno (TAP)* en el peritoneo, plasma y orina. La *tripsina* es la enzima clave en la activación de todos los zimógenos incluyendo su propio precursor el tripsinógeno. Las células acinares también sintetizan una proteasa, el *inhibidor de la tripsina pancreática secretada (PSTI)*, que neutraliza la tripsina intracelular potencialmente dañina (**Esquema 1.1.1**). Cuando la activación intrapancreática del tripsinógeno a tripsina sobrepasa la capacidad del PSTI, se produce una activación generalizada de las enzimas digestivas causando el daño pancreático. En condiciones normales únicamente una pequeña proporción del tripsinógeno se libera a la circulación, cuando pasa a tripsina activa es inmediatamente neutralizada por dos *inhibidores de la tripsina*, α 1-antitripsina y α 2-macroglobulina, el complejo tripsina-1- α 1-antitripsina transfiere la enzima a la α 2-macroglobulina antes de su eliminación. La α 2-macroglobulina libre tiene una vida media de 100 horas pero el complejo tripsina- α 2-macroglobulina se elimina por completo de la circulación a través del sistema retículo endotelial en menos de 10 minutos. Se han postulado dos teorías respecto al lugar y mecanismo de activación del tripsinógeno:

- *Teoría de la co-localización*: la activación celular intraacinar de enzimas digestivas se inicia por hidrolasas lisosomales (catepsina B) que, o bien actúan tras la fusión de los gránulos de zimógenos con los lisosomas, o bien no son segregadas adecuadamente por

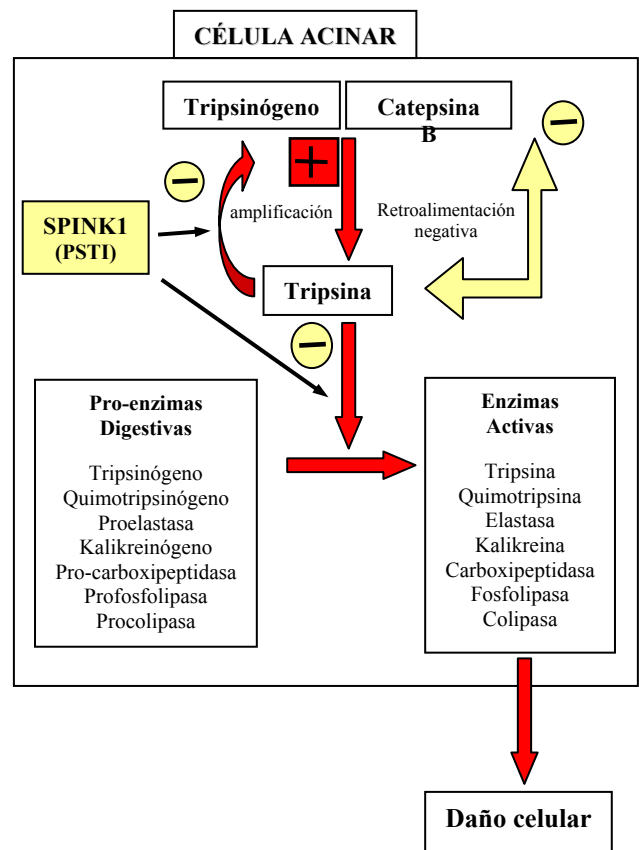
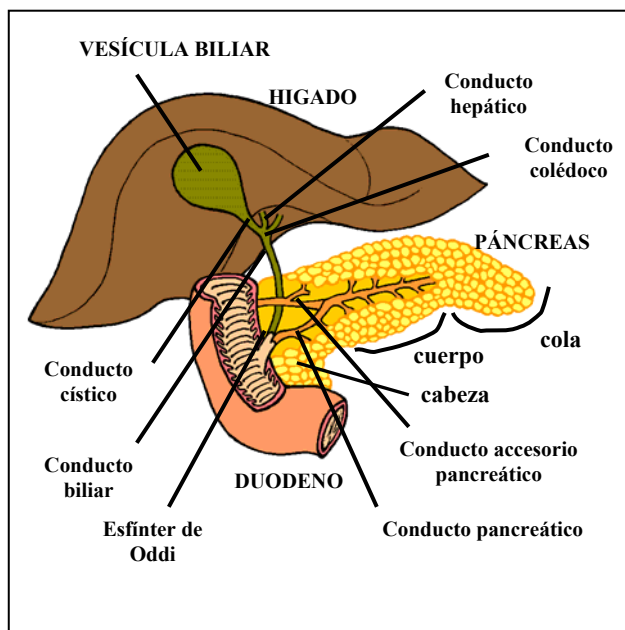
otras rutas de secreción y son secretadas junto a las enzimas digestivas. Sin embargo, la extensión de la co-localización no correlaciona con la gravedad de la enfermedad y el fenómeno también tiene lugar en células acinares normales.

➤ *Autoactivación del tripsinógeno*: en condiciones normales la tripsina activa es capaz de activar la catálisis de su propio precursor, el tripsinógeno. El proceso esta regulado por dos vías diferentes:

- La proteasa PSTI: actualmente llamada inhibidor de la serin-proteasa Kazal tipo 1 (SPINK1), inhibe las enzimas digestivas catalizadas por la tripsina y su propia autoactivación.
- La tripsina: esta enzima es capaz de inactivarse a sí misma de forma permanente por retroalimentación negativa mediante la hidrólisis de la cadena que une los dominios globulares (R122H).

Las mutaciones en el inhibidor de la tripsina SPINK1, que producen una proteína no funcional, y en el tripsinógeno, dando lugar a una tripsina con la cadena intraglobular mutada incapaz de inactivarse, provocan una acumulación de la tripsina (5, 6, 7).

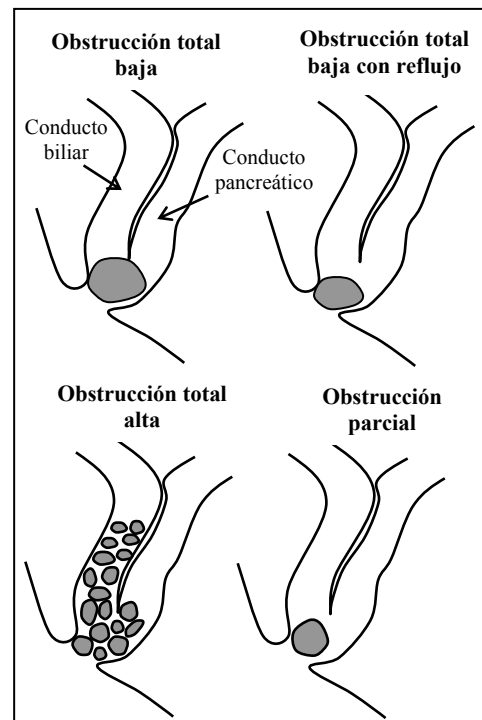
Esquema 1.1.1: Dibujo anatómico del páncreas y la vesícula biliar y esquema de la vía de activación del tripsinógeno en la célula acinar



Aunque los eventos iniciales

patogénicos de la PA no están del todo aclarados existen diversos factores que pueden contribuir al desarrollo de la patología, los más comunes son la colelitiasis y el abuso de alcohol pero también se incluyen factores metabólicos, infecciosos, iatrogénicos, vasculares, malformaciones congénitas y agentes tóxicos (fármacos) (8). Ciertas mutaciones en el inhibidor de la tripsina SPINK1 aumentan la susceptibilidad de padecer PA (9).

1.1.1. Litiasis biliar: es la causa más común de PA en los países desarrollados con cerca del 90% de casos. Las piedras generadas en la vesícula biliar obstruyen los conductos biliares y provocan el reflujo de bilis al conducto de Wirsung, la dilatación de los conductos biliares provoca una inflamación de la cabeza del páncreas con el consiguiente aumento de la presión intraductal del sistema excretor pancreático y la compresión del conducto distal común (10). Las piedras se generan por la precipitación de cristales de monohidrato de colesterol, y gránulos de bilirrubinato cálcico u otras sales de calcio embebidas en mucus de la vesícula (“barro biliar”). El incremento del pH de la bilis por inflamación de la vesícula y la consiguiente pérdida de función del epitelio secretor de mucus, disminuye la solubilidad del calcio y la bilirrubina. La formación del “barro biliar” rico en colesterol puede deberse a varios factores como la supersaturación de colesterol en la bilis, la estasis de la vesícula biliar o la nucleación de los cristales de colesterol (precipitación del colesterol por factores pro-nucleantes como la mucina, α 1-ácido glicoprotéico y aminopeptidasa N). Las piedras obstruyen los conductos biliares y desencadenan la colecistitis calculosa aguda y la colangitis, principales factores desencadenantes de la pancreatitis aguda en los países desarrollados, además, pueden actuar como cuerpos extraños que proporcionan un foco de infección bacteriana, la complicación más frecuente en esta patología. La formación de “barro biliar” y piedras es muy característica de pacientes críticos sometidos a nutrición parenteral (6% después de 3 semanas, 50% de 4-6 semanas, 100% a las 6 semanas), una de las manifestaciones



clínicas de este hecho es la pancreatitis aguda y supone una de las complicaciones añadidas al mantenimiento del soporte vital en la UCI (11).

1.1.2. Alcohol: constituye la segunda causa más frecuente de PA. El alcohol daña los receptores muscarínicos del páncreas, duodeno y esfínter de Oddi provocando un aumento de la sensibilidad a la acetilcolina. La respuesta a la acetilcolina provoca una hipertonicidad del duodeno y el esófago, y la relajación del esfínter de Oddi, esto desencadena un aumento de la presión intraduodenal que genera un reflujo duodenopancreático responsable del inicio del proceso pancreático (12).

1.1.3. Alteraciones metabólicas: la hipertriliceridemia y la hipercalcemia son las alteraciones metabólicas más frecuentes causantes de un pequeño porcentaje de los casos de PA. En la mayoría de los casos la hipertrigliceridemia, responsable de la pancreatitis hiperlipidémica, esta provocada por un metabolismo anormal de los lípidos asociado a factores secundarios desencadenantes (abuso de alcohol, diabetes no controlada, medicamentos o dieta rica en grasas). En el páncreas y en sus alrededores, el exceso de ácidos grasos libres procedentes de la hidrólisis de los triglicéridos provoca daño en células acinares y capilares pancreáticos generando un ambiente ácido responsable de la activación del tripsinógeno (13). La hipercalcemia causante de PA tiene orígenes etiológicos diversos (hiperparatiroidismo, leucemia de células T, mieloma múltiple, bypass cardiopulmonar y envenenamiento por vitamina D), el incremento del calcio intracelular acelera la conversión de tripsinógeno a tripsina y promueve la formación de cálculos que obstruyen los conductos pancreáticos (8).

1.1.4. Trauma e isquemia: la isquemia provocada por una operación o un traumatismo grave desencadenan una cascada inflamatoria que afecta a la microcirculación pancreática y provoca daño tisular desencadenando la PA (ver sección 1.6.4). Así mismo, los traumas abdominales graves y aquellos provocados por técnicas quirúrgicas como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) (ver sección 1.7.6.), utilizada para la eliminación de la litiasis biliar, pueden dañar algún conducto excretor biliar o pancreático provocando inflamación de la glándula y el consiguiente episodio de PA (8).

1.1.5. Fármacos: las drogas se relacionan con el 1-4% de los casos de PA. Entre los fármacos que pueden desencadenar la PA se encuentran la familia de las statinas (atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, simvastatina y pravastatina) (14), los fármacos con alta

toxicidad como los utilizados en el tratamiento del HIV (didanosina (DDI), pentamidina, antimonio pentavalente, sulfonamidas, corticosteroides, octreotide), la furosamida, la azatioprina, valproato sódico y los NAIDs estándar (15, 16).

1.1.6. Infecciones: una amplia variedad de agentes infecciosos se han asociado a la PA y a menudo son los responsables de la PA idiopática. Existen evidencias patológicas y radiológicas con infección bien documentada en infecciones por virus (HIV, hepatitis, mumps, coxsackie, hepatitis B, cytomegalovirus, varicella-zoster virus, herpes simplex virus), bacterias (*Mycoplasma*, *Legionella*, *Leptospira*, *Salmonella*), hongos (*Aspergillus*), y parásitos (*Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Ascaris*). El proceso que desencadena la pancreatitis es característico de cada agente infeccioso (17). Particularmente los pacientes infectados con el *virus humano de la inmunodeficiencia (HIV)* tienen un alto riesgo de padecer PA por varias razones: los medicamentos indicados para el tratamiento se asocian a daño pancreático por toxicidad directa de las células acinares, los pacientes están expuestos a infecciones relacionadas con el desarrollo de la patología, finalmente algunos pacientes tienen historial de abuso de alcohol y pueden desarrollar pancreatitis alcohólica. Aunque los síntomas que presentan estos pacientes son similares a los de los pacientes inmunocompetentes, el diagnóstico se dificulta por la presencia de otros problemas médicos (15). Aunque la PA asociada a hepatitis viral no fulminante es rara, existen casos documentados de *hepatitis A* y *B* con sintomatología característica de PA (dolor abdominal, altos niveles de amilasa, y tomografía de contraste y ultrasonido) añadida a la sintomatología de la hepatitis viral (18, 19).

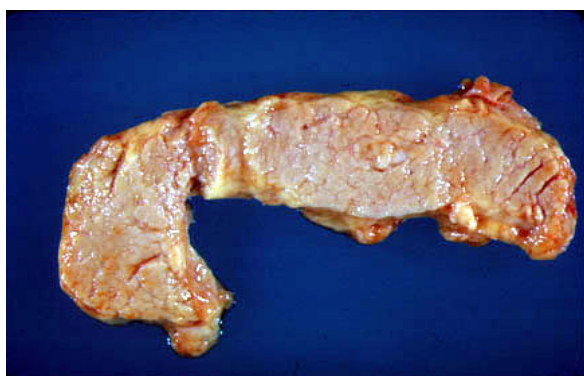
1.1.7. Autoinmune: la pancreatitis autoinmune se asocia más a procesos recurrentes o crónicos que a la fase aguda de la enfermedad y puede llegar a suponer el 30-40% de las pancreatitis crónicas de causa desconocida. Tanto la presencia de autoanticuerpos encontrados en pacientes con pancreatitis, dirigidos principalmente contra lactoferrina y anhidrasacarbónica II, como de linfocitos infiltrados en torno al conducto pancreático, puede estar relacionada con el desarrollo de una pancreatitis asociada a hipergammaglobulinemia. También es posible el desarrollo de una PA autoinmune como enfermedad secundaria a otra patología autoinmune como el Síndrome de Sjögren, la colangitis esclerosante primaria o la cirrosis biliar primaria (20, 21, 22) (ver sección 3.1.2).

1.1.8. Idiopática: en aproximadamente el 10% de los casos las técnicas de diagnóstico no permiten establecer la causa de la PA. La microlitiasis biliar oculta, puede ser la causa de las dos terceras partes de las PA idiopáticas pero también se incluyen la disfunción funcional (dismotilidad) u orgánica (estenosis) del esfínter de Oddi, anomalías de la anatomía biliar y pancreática (páncreas divisum, unión anómala del conducto pancreático biliar, páncreas anular, coledococoele), mutaciones genéticas y tumores (23, 24).

Estos factores desencadenan una cascada inflamatoria que se asocia a la activación enzimática intraglandular, con las consecuencias de daño microvascular, trombosis, necrosis tisular, saponificación del tejido graso, liberación de radicales libres y eventualmente desencadenamiento de una respuesta inflamatoria sistémica.

PÁNCREAS NORMAL

El páncreas es amarillo grisáceo con un tono uniforme a lo largo de todo el órgano



PANCREATITIS AGUDA

El páncreas muestra focos de necrosis blanco amarillento dispersos por la cabeza, cuerpo y cola, y una extensa zona hemorrágica y edematosa en la cola



1.2. Diagnóstico

El diagnóstico de Pancreatitis aguda está indicado en pacientes con dolor abdominal intenso, prolongado, localizado en hemiabdomen superior, especialmente si se acompaña de náuseas y/o vómitos, sensibilidad a la palpación abdominal y/o resistencia muscular. La existencia de signos como el shock, íleo, dolor dorsal, etc ayuda al planteamiento diagnóstico pero tienen baja sensibilidad. Los parámetros clínicos con mayor sensibilidad y especificidad para la confirmación diagnóstica de la pancreatitis son la elevación 2 veces sobre el rango normal de la lipasa sérica y la elevación 4 veces sobre el rango normal de la amilasa sérica, sin embargo su sensibilidad y especificidad decae rápidamente tras las primeras 24 horas de iniciado el cuadro clínico y los valores no correlacionan con la gravedad local o sistémica de la patología (**Tabla 1.2.1**). La lipasa tiene mayor duración en el tiempo que la amilasa,

permanece elevada durante 7-14 días, y no presenta alteración por otras fuentes, mientras que la amilasa muestra un pico entre las 2-12 horas de comenzado el ataque con una normalización a los 3-5 días (25, 26, 27). Las determinaciones de valores urinarios de enzimas o clearance, como también la medición de isoenzimas, no mejoran de manera significativa la sensibilidad y especificidad.

Tabla 1.2.1: Sensibilidad y especificidad de síntomas, signos, antecedentes y parámetros diagnósticos

Síntomas y signos	Sensibilidad (%)		Especificidad (%)	
Dolor abdominal	95			
Náuseas, vómitos	75			
Ruidos hidroaéreos disminuidos	60			
Fiebre	60			
Dolor irradiado al dorso	50			
Resistencia muscular	50			
Shock	15			
Ictericia	15			
Hematemesis	10			
Antecedentes				
Anorexia	85			
Historia de alcoholismo	≈ 50			
Enfermedad de la vía biliar	≈ 30			
Parámetros clínicos	24 horas	4° día	24 horas	4° día
Amilasa	82	60	91	40
Lipasa	94		96	

Además de la sintomatología y las pruebas de laboratorio, el uso de técnicas radiológicas y de ultrasonido aporta información complementaria al diagnóstico clínico. Las pruebas radiológicas, radiografía simple abdominal y de tórax, no permiten establecer el diagnóstico de PA pero pueden contribuir al diagnóstico diferencial y muestran alteraciones propias de la pancreatitis. Por otro lado, las técnicas de ultrasonido pueden aportar datos para el diagnóstico inicial y etiología (ecotomografía abdominal), o contribuir a determinar la gravedad de la patología (tomografía computerizada de abdomen (TAC)):

- *Radiografía simple de abdomen:* permite el diagnóstico diferencial, como la perforación de víscera hueca y la obstrucción intestinal, y pueden observarse alteraciones características de la pancreatitis como íleo localizado en el yeyuno “asa centinela”, íleo generalizado con niveles hidroaéreos, distensión aislada del colon transversal “signo del colon interrumpido”, distensión duodenal con niveles hidroaéreos, pseudoquistes.

- *Radiografía de Tórax*: puede mostrar atelectasias, elevación diafragmática, infiltrados alveolo-intersticiales (SDRA) o derrame pleural (más frecuente izquierdo) presentes en el 10-20% de los enfermos.
- *Ecotomografía abdominal*: no tiene una alta sensibilidad debido a la mala visualización del páncreas en el 25-50% de los casos pero, en aquellos casos con buena visibilidad, puede aportar al diagnóstico inicial la presencia o no de edema pancreático. Aunque esta prueba permite mostrar la presencia de patología biliar, un resultado negativo de la misma no descarta el diagnóstico de pancreatitis aguda o de patología biliar concomitante.
- *Tomografía Axial Computerizada (TAC)*: se usa principalmente en la clasificación de gravedad para determinar el grado de inflamación peripancreática (coleciones) y la existencia, localización y extensión de la necrosis pancreática, su mayor rendimiento tiene lugar entre el tercer y décimo día de evolución (28, 29). El uso de líquido de contraste en esta técnica es fundamental para el diagnóstico de necrosis y colecciones líquidas, aunque se ha postulado que el líquido de contraste podría complicar la evolución de la pancreatitis aguda, un reciente estudio randomizado en humanos señala que la aplicación de TAC con contraste no agrava la gravedad de la PAG (30).

1.3 Clasificación de la Pancreatitis aguda. Criterios de gravedad.

El diagnóstico adecuado de la Pancreatitis aguda leve o grave tiene gran implicación pronóstica y terapéutica. La combinación de criterios objetivos, clínicos y de laboratorio conjuntamente con la estratificación por TAC, constituye la mejor aproximación actual a la clasificación de la PA mediante la aplicación de diversos índices basados en los valores obtenidos de las pruebas diagnósticas. Los Criterios de Ranson (31), basados en valores bioquímicos y hematológicos medidos al inicio y 48 horas después del inicio de los síntomas, han demostrado un bajo valor predictivo siendo de alguna utilidad únicamente aquellos criterios individuales relacionados con el fallo multiorgánico (insuficiencia renal o respiratoria y shock) y edad avanzada (32). Nueve criterios adaptados de Ranson, conocidos como Criterios de Glasgow o Índice Imrie (33), fueron adoptados desde 1984 como indicador pronóstico de gravedad, sin embargo su valor predictivo no supera el 70-80% (Tabla 1.3.1). El índice APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) (34) es de uso frecuente en las unidades de cuidados intensivos, utiliza un sistema de puntuación basado en los valores

iniciales (primeras 24h) de 12 medidas fisiológicas rutinarias (puntuación A), de la edad (puntuación B), y del estado de salud anterior (puntuación C) (**Tabla 1.3.2**), su aplicación al ingreso o dentro de las primeras 48 horas permite diferenciar la PAL de la PAG. Además su utilización en cualquier momento de la evolución es una indicación de la gravedad del paciente y del progreso o deterioro de la pancreatitis. Un índice superior a 9 indica PAG pero este nivel de corte puede excluir muchos pacientes que desarrollarán complicaciones en la primera semana, un índice de 6 permite una sensibilidad de 95% en el caso de complicaciones pero disminuye el valor predictivo a un 50% (35). Dentro de los criterios de gravedad, la información aportada por el TAC es fundamental para determinar el grado de inflamación peripancreática (TAC sin contraste) y caracterizar la necrosis del páncreas (TAC con contraste) en la PAG. El grado de inflamación peripancreática se refleja clásicamente en los Criterios de Balthazar (29) pero el mejor valor predictivo se obtiene de la combinación de estos criterios con el grado de necrosis (**Tabla 1.3.3**).

Tabla 1.3.1: Criterios de gravedad de Ranson y Glasgow usados actualmente en la clasificación de pacientes con Pancreatitis aguda

Criterios de Ranson ³¹			Glasgow según Blamey ³³
	Alcohólica	Biliar	
Al ingreso			
Edad	> 55 años	> 70 años	Edad > 55 años
Leucocitos	> 16.000 mm ³	> 18.000 mm ³	Leucocitos > 15000/mm ³
Glucemia	> 200 mg/dl	> 200 mg/dl	Glucemia > 10 mmol/l
LDH	> 350 U/l	> 400 U/l	Urea > 16 mmol/l
AST	> 250 U/l	> 250 U/l	PaO ₂ < 60 mmHg
			Calcemia < 2 mmol/l
			Albuminemia < 3.2 g/l
			LDH > 600 U/l
A las 48 horas			
Descenso del hematocrito	> 10%	> 10%	
Aumento del BUN	> 5 mg/dl	> 2 mg/dl	
Calcemia	< 8 mg/dl	< 8 mg/dl	
PaO ₂	< 60 mg/dl		
Déficit de bases	> 4 mEq/l	> 5 mEq/l	
Secuestro de líquidos	> 6 l	> 4 l	
Nº de factores	Mortalidad		Clasificación
0-2	< 1%		0-2 criterios Leve-Moderada ≥ 3 criterios Grave
3-4	≅ 15%		
5-6	≅ 40%		
> 6	≅ 100%		

Tabla 1.3.2: Sistema de clasificación APACHE II³⁴

A	Valores fisiológicos	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4	Puntuación
Temperatura rectal		>41	39-40.9		38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	<29.9	
Presión arterial media		>160	130-159	110-129		70-109		50-69		<49	
Frecuencia cardiaca		>180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	<39	
Frecuencia respiratoria		>50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<5	
AaO ₂ (FiO ₂ <0.5)		>500	350-499	200-349	<200						
PaO ₂ (FiO ₂ <0.5)					>70	61-70			55-60	<55	
pH arterial (CO ₃ H)		>7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15	
Sodio		>180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	110-119	<110	
Potasio		>7.0	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2.5	
Creatinina		>3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6			
Hematocrito		>60		50-59.9	46-46.9	30-45.9		20-20.9		<20	
Recuento de leucocitos		>40000		20000 39000	15000 19000	3000 14900		1000 2900		<1000	
Escala de coma (Glasgow)		-1	-2	-3	-4	-5	-6	(15-)			
Ojos abiertos		sin respuesta	estímulo doloroso	estímulo verbal	espontáneamente						
Respuesta motora		sin respuesta	decerebrado	decorticado	retracción al dolor	localiza el dolor	estímulo verbal				
Verbal <u>no intubado</u>		sin respuesta	sonidos incomprensibles	palabras inapropiadas	desorientación y parloteo	orientado y conversando					
Verbal <u>intubado</u>		generalmente sin respuesta		habilidad para hablar cuestionable		parece capaz de hablar					
B	Edad (años)	0	+2	+3	+5	+6	Puntuación				
		< 44	45-54	55-64	65-74	> 74					
C	Enfermedad crónica anterior	0	+2	+5	Puntuación						
		Ausencia	Complicaciones en el postoperatorio de una intervención electiva	Fallo orgánico grave o inmunodeficiencia demostrada en un contexto no quirúrgico o en el postoperatorio de una intervención de urgencia							
La puntuación varía entre 0 y 71. Cuanta más alta es la puntuación, mayor es la probabilidad de muerte.											(A+B+C)

Tabla 1.3.2: Combinación de los Criterios de Balthazar y grado de necrosis utilizados en la caracterización del índice de gravedad en la PAG

Criterios de Balthazar ³³		
Alteraciones en TAC sin contraste	Grado	Puntos
Normal	A	0
Aumento de tamaño focal o difuso	B	1
Aumento de tamaño + inflamación peripancreática	C	2
Colección líquida única	D	3
≥ 2 colecciones líquidas	E	4
	% de necrosis	Puntos
Índice de necrosis en TAC con contraste	0%	0
	< 30%	2
	30-50%	4
	> 50%	6
El índice combinado da una puntuación máxima de 10		
≤ 3 puntos Leve		
4-6 puntos Moderada		
> 6 puntos Grave		

La necesidad de unificar criterios y terminología entre los diferentes hospitales llevó a la creación de una clasificación general, el Sistema de Clasificación de Atlanta (36) (Simposio Internacional de Pancreatitis Aguda, Atlanta 1992), basada en las complicaciones desarrolladas por el paciente en las primeras semanas, si hay complicaciones el diagnóstico será de PAG mientras que si no se presentan estaremos ante un caso de PAL. Según esta clasificación se desestima el uso de términos como flegmón y pancreatitis hemorrágica y se recomiendan las siguientes definiciones:

- *Pancreatitis aguda leve*: proceso inflamatorio pancreático agudo cuyo hallazgo patológico fundamental es el edema intersticial de la glándula y apenas existe repercusión sistémica.
- *Pancreatitis aguda grave*: proceso inflamatorio pancreático asociado a fallo orgánico sistémico y/o complicaciones locales como necrosis, pseudoquiste o absceso. Generalmente es consecuencia de la existencia de necrosis pancreática aunque ocasionalmente la pancreatitis edematosa puede presentar evidencias de gravedad.
- *Necrosis*: zonas localizadas o difusas de tejido pancreático no viables que se asocian generalmente a necrosis grasa peripancreática. En la tomografía se aprecian como zonas con densidad menor que la del tejido normal pero mayor que la densidad líquida y que no incrementan su densidad con el medio de contraste.
- *Colecciones líquidas agudas*: colecciones de densidad líquida que carecen de pared y se presentan precozmente en el páncreas o cerca de él.
- *Pseudoquiste*: formación de densidad líquida caracterizada por la existencia de una pared de tejido fibroso o granuladorio que aparece posteriormente a las cuatro semanas desde el inicio de la pancreatitis.
- *Absceso pancreático*: colección circunscrita de pus, en el páncreas o su vecindad, que aparece como consecuencia de una pancreatitis aguda y contiene escaso tejido necrótico en su interior.

1.4. Marcadores predictivos

En los últimos años se han propuesto varias variables como prueba única de laboratorio para la predicción temprana de la gravedad en la PA (37). Estas variables pueden clasificarse en tres categorías:

- Pruebas relacionadas con el grado de reacción inflamatoria, reactivos de fase aguda y mediadores de procesos inflamatorios. Aunque el mecanismo de acción de estos factores suele

ser autocrino y paracrino, es decir actúan sobre la propia célula productora y sobre células circundantes, pueden encontrarse niveles mensurables de estos marcadores en la circulación. Se incluyen en este grupo elastasas de polimorfonucleares, proteína C reactiva, citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleuquina 6 (IL6) e IL8, y marcadores celulares sistémicos de inflamación e inmunosupresión.

- Pruebas relacionadas con la activación del tripsinógeno y otras proenzimas pancreáticas como el complejo inhibidor de la tripsin- α 1-proteasa en suero, el péptido de activación del tripsinógeno (TAP) en orina, y el péptido de activación de la carboxipeptidasa B (CAPAP) en suero y orina.
- Pruebas que miden el leakage de ciertas enzimas de la glándula pancreática como el tripsinógeno 2, la lipasa pancreática y la elastasa pancreática en suero y orina.

1.4.1. Marcadores de inflamación

➤ *Proteína C reactiva (CRP)*: es un reactivo de fase aguda sintetizado por los hepatocitos como respuesta a la liberación de IL1 e IL6. La CRP es el marcador mas usado actualmente para la predicción de gravedad de la PA, el pico máximo de expresión en suero se produce aproximadamente a los tres días del inicio del dolor abdominal y siempre es posterior al pico máximo de las interleuquinas. Los niveles de corte han sido ampliamente discutidos en la bibliografía, en general se acepta que valores entre 120 mg/L y 210 mg/L permiten diferenciar una PA leve de una grave, además niveles superiores a 120 mg/L una semana después del inicio de los síntomas tiene alto valor predictivo del desarrollo de necrosis pancreática infectada (38,39). Sin embargo, su efectividad como marcador predictivo temprano es limitada respecto de otros marcadores como el TAP o el tripsinógeno urinario 2 (40).

➤ *TNF α* : es una citoquina proinflamatoria, con efectos pleitrópicos, producida predominantemente por los macrófagos. Es un mediador común en la mayoría de las respuestas patofisiológicas desarrolladas por el organismo frente al daño tisular y la sepsis (ver sección 2.4.1). La alteración del balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias constituye la base de la hipótesis más defendida actualmente en la patogénesis de la PA y la progresión hacia la forma grave de la enfermedad. Numerosos estudios en modelos experimentales y pacientes con PA demuestran un aumento de TNF α en fases tempranas de la enfermedad. El incremento de los niveles séricos tiene valor predictivo de gravedad diagnóstico y pronóstico y se asocia a la aparición de complicaciones sistémicas (ver sección 3.3.1).

➤ *Interleuquina-6 (IL6)*: es el mediador principal en la síntesis de proteínas de fase aguda como el fibrinógeno y la CRP (ver sección 2.4.1). Al igual que el $\text{TNF}\alpha$, la IL6 es un marcador predictivo temprano de gravedad, el aumento de los niveles séricos en las primeras 24h posee el mayor índice de especificidad y sensibilidad para discriminar entre PAL y PAG dentro de las citoquinas proinflamatorias asociadas a la patogénesis de la PA (ver sección 3.3.1).

➤ *Interleuquina-8 (IL8)*: varios estudios apuntan a esta citoquina, producida por neutrófilos tras su activación por $\text{TNF}\alpha$ (ver sección 2.4.1), como principal mediador secundario en los procesos inflamatorios producidos durante un ataque de PA. La IL8 sérica se encuentra elevada durante el curso de la PA y correlaciona con la evolución clínica, el aumento de los niveles séricos, así como la formación de inmunocomplejos, se asocia a la aparición de ARDS, una de las complicaciones más graves en la PAG (ver sección 3.3.1).

➤ *Interleuquina-10 (IL10)*: es una citoquina anti-inflamatoria asociada a procesos inflamatorios crónicos y agudos (ver sección 2.4.1). El aumento de los niveles de IL10 y el balance con otras citoquinas pro-inflamatorias tienen valor predictivo de fallo orgánico (41, 42). En el curso de la enfermedad la predicción temprana del desarrollo de complicaciones es fundamental, la combinación de IL10 plasmática y Ca^{2+} séricos tiene mayor valor predictivo de fallo orgánico, dentro de las primeras 12h de admisión hospitalaria, que un único marcador o el índice APACHE II (43). Así mismo, el uso terapéutico de esta citoquina reduce los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias y amilasa, disminuye el daño pancreático y aumenta la supervivencia en modelos experimentales, y parece tener efecto preventivo del desarrollo de PA post-ERCP en pacientes (44) (ver sección 3.3.1 y 3.3.2).

Los marcadores de inflamación en general tienen una desventaja, no siempre están presentes al inicio del ataque sino que se desarrollan más tarde durante el curso de la enfermedad y, por lo tanto, no pueden ser usados como diagnóstico temprano de la gravedad de la PA. Sin embargo, correlacionan muy bien con la evolución de la enfermedad y pueden ser usados para monitorizar el curso de la misma.

1.4.2. Marcadores de activación del tripsinógeno

➤ *Complejo inhibidor de la tripsina- α 1-proteasa*: los indicadores bioquímicos de PA incluyen a las antiproteasas y sus complejos con la tripsina. Los pacientes con PA muestran altas concentraciones en suero de la tripsina-1- α 1-antitripsina en fases muy tempranas de la enfermedad (24-48h), y los niveles de expresión correlacionan con la gravedad (5, 26). Aunque

la tripsina-1- α 1-antitripsina reúne los requisitos para ser un buen marcador diagnóstico y pronóstico, se han observado altos niveles de este complejo en suero de pacientes con úlceras perforadas y otras enfermedades relacionadas con daño de la barrera gastrointestinal, lo que reduce su especificidad (26). Por otro lado, el complejo formado por el tripsinógeno 2 y la α 1-antitripsina tiene un gran valor diagnóstico en las primeras 12h de admisión y un alto grado de discriminación entre la forma moderada y la grave respecto a otros marcadores tempranos (5). Estudios recientes han demostrado que el ratio de tripsina-2- α 1-antitripsina:tripsinógeno 1 es un prometedor nuevo indicador para discriminar entre PA biliar y PA alcohólica (45). Otro posible marcador bioquímico relacionado con los complejos de antiproteasas es la α 2-microglobulina, la proteína a la cual la antiproteasa transfiere la tripsina formando el complejo tripsina- α 2-microglobulina. Los pacientes con PA grave muestran un incremento de la concentración del complejo α 2-microglobulina en suero, además las concentraciones de la α 2-microglobulina libre son significativamente más bajas en ataques de PA con complicaciones sugiriendo su excesivo consumo (5, 37). Pese a ser buenos marcadores predictivos de la gravedad de la PA, ninguna de las formas de la α 2-microglobulina es adecuada para su uso clínico debido al grado de complejidad y el tiempo necesario para su detección.

➤ *Péptido de activación del tripsinógeno (TAP)*: este pequeño péptido (8 aminoácidos con un peso aproximado de 900 daltons) se origina durante la activación del tripsinógeno por escisión enzimática de su N-amino-terminal. El TAP refleja la cantidad de tripsinógeno activado intrapancreático patológico, independientemente de si la tripsina generada permanece activa o es neutralizada por los inhibidores de tripsina, y está especialmente relacionado con las fases tempranas de la PA (5). Tanto la concentración del TAP urinario como el ratio TAP urinario/creatinina son buenos marcadores predictivos de gravedad pero, debido a su rápida eliminación por el riñón, los valores únicamente son estables dentro de las primeras 24-48h del inicio de los síntomas reduciéndose rápidamente la sensibilidad y especificidad de la prueba, y mostrando un patrón muy variable más allá de este rango temporal (46, 47). Otros inconvenientes son su nulo valor predictivo en el caso de la PAL post-ERCP y la ausencia de variación en función de la etiología, lo que impide identificar la causa de la PA (5). La combinación del TAP urinario con otros marcadores de inflamación como la CRP mejora el valor predictivo de esta molécula, la combinación de ambos marcadores

incrementa en 20-55% la probabilidad de desarrollar una PAG (48). En general, la característica clínica más favorable del TAP urinario es su capacidad de diferenciar entre las formas leve y grave de la PA en fases muy tempranas de la enfermedad respecto a otros métodos utilizados (6, 49, 50).

➤ *Péptido de activación de la carboxipeptidasa B*: en un estado normal los inhibidores locales de la tripsina inactivan la tripsina dentro y en los alrededores del páncreas. Sin embargo, cuando la tripsina excede la capacidad de estos inhibidores se produce la activación de los otros zimógenos por la tripsina activa, liberando como resultado péptidos cuya medida refleja la cantidad de tripsina. De entre ellos el péptido de activación de la carboxipeptidasa resultante de la escisión enzimática de la procarboxipeptidasa B, es el de mayor tamaño (10.000 daltons), lo que le confiere una mayor estabilidad para permitir su medida en suero y orina (5). Los niveles de CAPAP en orina y suero correlacionan con la gravedad de la PA, aunque los primeros estudios no otorgaban una buena especificidad diagnóstica a esta prueba, datos más recientes demuestran un alto valor predictivo diagnóstico del CAPAP B y una mayor precisión respecto a otros marcadores como el TAP 24h después del inicio de los síntomas (49, 51).

Los marcadores de activación del tripsinógeno son los mejores marcadores predictivos en fases muy tempranas de la enfermedad, con un pico máximo entre 1-2 días tras el inicio del dolor abdominal, sin embargo decrecen muy rápidamente, independientemente de la evolución de la enfermedad. Este descenso tan rápido deja una “ventana diagnóstica” muy limitada, que se reduce aún más si tenemos en cuenta que muchos pacientes ingresan a los 2-3 días del inicio del dolor abdominal, y en otros casos son redirigidos desde otros centros hospitalarios. También hay que tener en cuenta que estos marcadores no son aceptables para el seguimiento del paciente por la misma razón.

1.4.3. Marcadores de liberación de enzimas pancreáticas

➤ *Amilasa*: tradicionalmente el diagnóstico bioquímico de la PA se ha basado en la determinación en suero de la amilasa cuya actividad se incrementa en las 2-12h del inicio de los síntomas y retorna a los valores normales a los 3-5 días (25, 27). Sin embargo, aproximadamente un 19% de los pacientes con PA tienen valores normales de amilasa y la hiperamilasemia es una característica de otras enfermedades extrapancreáticas, lo que reduce mucho la especificidad de este marcador (52, 53). Esta generalmente aceptado que el grado de elevación de la amilasa en suero y orina correlaciona muy poco con la gravedad y el

pronóstico de la enfermedad. Si acaso, se ha postulado que puede existir una relación inversa entre la amilasa y la gravedad de la enfermedad, ya que en algunos pacientes diagnosticados de PAG los niveles de esta enzima son normales o están ligeramente elevados (26).

➤ *Trisínógeno 2*: la liberación de tripsinógeno en suero y orina es una medida indirecta del daño causado a las células acinares por acción de la tripsina. Hay dos isoenzimas del tripsinógeno, el tripsinógeno 1 catiónico y el tripsinógeno 2 aniónico, en sujetos sanos la principal forma tanto en fluido pancreático como en suero es el tripsinógeno-1 (5). En pacientes con PA los niveles séricos de tripsinógeno 2 son considerablemente superiores a los de tripsinógeno 1, además se excreta en grandes cantidades en orina y su concentración se eleva en las primeras horas tras el inicio de los síntomas (5). La medida cuantitativa de esta proteína en suero y orina muestra una marcada correlación con la gravedad de la enfermedad, constituye un evento predictivo de complicaciones en el paciente, y permite discriminar entre PA alcohólica y biliar (40, 54).

➤ *Lipasa*: la lipasa pancreática es sintetizada, de manera similar a la amilasa, en las células acinares exocrinas y cataliza la hidrólisis de triglicéridos en diglicéridos y ácidos grasos, es más específica del páncreas que la amilasa y por lo tanto mejor marcador de PA. La principal ventaja de la lipasa frente a la amilasa es una mayor sensibilidad para el diagnóstico retardado de la PA, debido a la diferencia temporal entre el inicio de los síntomas y el ingreso del paciente en el hospital, así como en el diagnóstico etiológico de la PA alcohólica (5,53). Sin embargo, al igual que ocurre con la amilasa los niveles muestran poca correlación con la gravedad de la patología. En general se considera que la medida de la amilasa y la lipasa séricas por sí solas no son suficientes en la detección de la PA (27, 53).

Quizás la principal ventaja de estos marcadores es la posibilidad de medirlos rápidamente y por métodos simples, el tripsinógeno 2 cuya eliminación en orina es un marcador muy temprano de daño en las células acinares se mide en pocos segundos mediante tiras que viran de color (55). Así pues son buenos marcadores diagnósticos pero no pronósticos a largo plazo.

La utilización de algunas de estas variables y de otras variables clínicas es la base de los dos principales Criterios de Gravedad utilizados en el diagnóstico y pronóstico de la PA, los *Criterios de Ranson* y el *APACHE II*. El *APACHE II* tiene mayor valor predictivo de gravedad que el índice de Ranson y permite la evolución continuada del paciente durante todo

el periodo de hospitalización del paciente (41, 56). Sin embargo, se necesitan 12 medidas fisiológicas además de otros valores adicionales de edad y salud crónica lo que aumenta mucho la complejidad, por esa razón los sistemas clínico-bioquímicos raramente son usados como sistemas rutinarios en la práctica clínica (57). Además de las variables bioquímicas y fisiológicas, la presencia y extensión de la necrosis pancreática, medida por los *Criterios de Balthazar*, así como la infección del tejido necrosado se asocian al desarrollo de fallo orgánico en la PAG, siendo la necrosis pancreática infectada el marcador predictivo más significativo de mortalidad (58). Así mismo, la duración del fallo orgánico también constituye un marcador predictivo de un desenlace fatal, la persistencia del fallo orgánico durante la primera semana de la PAG se asocia a riesgo de muerte y al desarrollo de complicaciones locales mientras que su resolución dentro de las 48 horas posteriores a su aparición sugiere una buena prognosis (59).

El conocimiento global sobre el valor predictivo diagnóstico de los marcadores estudiados demuestra que no existe una variable única con la suficiente especificidad y sensibilidad para establecerse como test diagnóstico de rutina. Probablemente el futuro del diagnóstico y pronóstico de gravedad de alta fiabilidad en la PA resida en el uso combinado de marcadores de inflamación, bioquímicos y fisiológicos junto con el índice de gravedad APACHE II. Además es necesaria la aplicación de nuevos conceptos como la identificación de polimorfismos genéticos que predispongan al desarrollo de complicaciones (60).

1.5. Diagnóstico etiológico

1.5.1 Patología Biliar

El proceso diagnóstico en pancreatitis aguda incluye la búsqueda de la etiología, lo que tiene gran importancia en la toma de decisiones y el tratamiento médico quirúrgico de la enfermedad. El diagnóstico etiológico incluye elementos anamnésicos como ingesta de alcohol, transgresión alimentaria, infecciones virales recientes, trauma, dislipidemia, infección por VIH, uso de medicamentos, etc...

Requieren tratamiento específico y por lo tanto diagnóstico oportuno la pancreatitis de origen metabólico (dislipidemia, hipercalcemia) y, especialmente, de origen biliar, es decir secundaria a obstrucción coledociana litiásica. Los pacientes con coledocolitiasis obstructiva no diagnosticada pueden evolucionar de manera desfavorable por la falta de tratamiento

oportuno de su patología de base. El diagnóstico es especialmente difícil cuando se trata de microlitiasis (11, 24).

La ecotomografía como técnica diagnóstica es muy útil en el diagnóstico biliar pero su sensibilidad se sitúa en torno al 80%, por lo tanto, en casos de ictericia marcada y/o dilatación de la vía biliar sin presencia de cálculos visibles en la ecotomografía se recomienda el uso de métodos complementarios que aseguren el diagnóstico y con ello la necesidad de una ERCP terapéutica urgente. Los métodos complementarios más utilizados son la medición en laboratorio de *parámetros clínicos* relacionados con el metabolismo hepático, dentro de las primeras 12 horas desde el ingreso, y el uso de *técnicas de imagen* como la ecografía endoscópica o colangiorresonancia (29, 61).

➤ *Parámetros clínicos*: el test de función hepática (LFT), que incluye la bilirrubina y fosfatasas alcalinas (ALP, ALT y AST), muestra una sensibilidad moderada en el diagnóstico de la patología biliar, y valores normales de estos parámetros no permiten excluir la etiología biliar (62). Aunque existe correlación entre la bilirrubina, fosfatasa alcalina, y anomalías ultrasonográficas y la presencia de colodocolitiasis, su sensibilidad individual, especificidad y valores predictivos son bajos. Así pues, la ERCP no está indicada en el caso de que los parámetros bioquímicos den normales o sin evidencia ultrasonográfica de sistema biliar dilatado (63). No obstante, el incremento de los niveles de ALT sérica (≥ 80 IU/L), en las primeras 24h de admisión del paciente, tiene mayor valor predictivo de colelitiasis respecto a las técnicas de ultrasonido (61). Si las transaminasas siguen aumentando con la progresión del brote inflamatorio es muy probable que el cálculo se encuentre aún presente en el colédoco pero, puesto que la sensibilidad de este marcador es baja, unos niveles normales de estas enzimas no excluyen el diagnóstico de patología biliar.

➤ *Técnicas de imagen*: la ecografía endoscópica y la colangiorresonancia permiten el diagnóstico de cálculos u otras patologías ampulares o ductales (coledococoele, malformación del esfínter de Oddi) y pueden constituirse en herramientas fundamentales para el manejo de casos complejos. La sensibilidad y especificidad de las técnicas de imagen mediante ultrasonido (USS) es de 86% y 100% respectivamente según un estudio reciente (61).

Así pues elementos clínicos, bioquímicos y ecográficos de amplia disponibilidad como los descritos previamente son los de mayor utilidad en el diagnóstico de la mayor parte de los casos de pancreatitis biliar. La combinación de LFT y USS detecta o excluye una etiología

biliar en casi todos los casos. La terapia endoscópica temprana mediante ERCP o enfinterotomía endoscópica (EE) reduce la morbilidad y mortalidad en pacientes con PA biliar que tienen criterios de gravedad y en los cuales no esta indicado la práctica de una colecistectomía. En estos casos las nuevas modalidades de diagnóstico basadas en las técnicas de imagen pueden contribuir a un diagnóstico rápido y específico (64, 65).

1.5.2. Patología grave infectada

Una de las complicaciones más frecuentes de la PA con necrosis pancreática es la infección del páncreas, ya sea por traslocación bacteriana de la flora intestinal, principal mecanismo de infección que ocurre precozmente, o por vía biliar o hematógena desde catéteres venosos. El conocimiento de los mecanismos involucrados en la infección y las bacterias participantes facilita una adecuada decisión clínica. Las bacterias más frecuentes son las enterobacterias relacionadas con la traslocación bacteriana desde el intestino (66) pero también se detecta la presencia de *Staphylococcus aureus* y hongos, más relacionados con la infección por catéter, cuya frecuencia podría aumentar por el uso de antibióticos de amplio espectro (67) (**Tabla 1.5.2.**). La infección monomicrobiana tiene lugar entre el 55 y el 60% de los casos de necrosis infectada mientras que la polimicrobiana esta presente en el 40-45%, sin embargo esta tasa aumenta en el caso de un absceso pancreático.

Tabla 1.5.2: Agentes etiológicos de la necrosis pancreática infectada

Bacilos gram (-): Enterobacterias (50-75%)	<i>Escherichia coli</i>	25-35%
	<i>Klebsiella spp.</i>	10-25%
	<i>Enterobacter spp.</i>	3-7%
	<i>Proteus spp.</i>	8-10%
Otros bacilos gram (-)	<i>Pseudomonas spp.</i>	11-16%
Cocos gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	14-15%
	<i>Enterococcus spp.</i>	4-7%
Anaerobios		6-16%
Hongos	En aumento	

Los pacientes con PA tienen una alta probabilidad de desarrollar infección pancreática cuando presentan:

- alteraciones locales susceptibles de infectarse: necrosis y/o colecciones agudas.

- deterioro clínico (aumento de APACHE II, aparición de fiebre o dolor abdominal, aumento del íleo o de signología peritoneal), hemocultivos positivos o aparición de gas en el retroperitoneo.

Frente a la sospecha diagnóstica, la manera de establecer el diagnóstico de infección de la necrosis y/o las colecciones es la punción percutánea guiada por ecotomografía o tomografía. La presencia de bacterias Gram o de cultivos positivos en el material obtenido por punción pancreática establece el diagnóstico de infección.

Se ha estudiado el valor de mediciones de parámetros aislados como CRP (48), procalcitonina o IL8 (38, 68, 69) para el diagnóstico de infección de la necrosis. Aunque los resultados no presentan la suficiente sensibilidad y especificidad como para reemplazar los métodos tradicionales, los avances en el diseño de nuevos test rápidos, principalmente en el caso de la procalcitonina, suponen técnicas no invasivas que complementan con alto poder diagnóstico las técnicas habituales (70).

1.6. Pancreatitis aguda y shock

El shock y la Pancreatitis aguda están relacionados clínicamente de dos maneras, la primera es la posibilidad de sufrir un shock asociado a complicaciones en la Pancreatitis aguda grave, y la segunda es la relación inversa, en la que la PAG es una afección secundaria al shock sistémico o la isquemia. La relevancia clínica del shock en la progresión de la PAG es clara y su significación clínica y pronóstica constituye un punto clave en el tratamiento del paciente.

1.6.1. El shock en la pancreatitis aguda grave o necrotizante

La PA esta definida por un número de complicaciones sistémicas de las cuales el shock es una de las más importantes, aproximadamente el 20-30% de los pacientes con PA necrotizante sufren uno o más episodios de shock caracterizados por una presión sistólica de ≤ 80 mmHg durante más de 15 minutos (36). Dentro de los *Criterios de Atlanta* únicamente un índice APACHEII ≥ 8 puntos, el fallo renal y el shock constituyen factores predictivos independientes de un desenlace fatal. La aparición del shock tiene un altísimo valor predictivo de gravedad durante el curso de una pancreatitis aguda (58, 71).

El shock temprano tiene lugar en las primeras horas tras el inicio de la pancreatitis como secuela de la hipovolemia y la deshidratación. Hace unas pocas décadas, shock y empeoramiento hemodinámico eran las causas más frecuentes de muerte, en 1970, Cogbill y

Song informaron sobre una mortalidad del 23% en una serie de pacientes no seleccionados con pancreatitis aguda. Con los avances en cuidados intensivos y resucitación, la muerte temprana relacionada con el shock hipovolémico en las primeras horas del episodio de pancreatitis es un hecho muy poco frecuente, actualmente son las infecciones locales y sistémicas las complicaciones más serias en esta enfermedad (72-74). Aunque los pacientes con necrosis estéril tienen un alto índice de supervivencia, el desarrollo de shock tiene un alto valor predictivo de muerte, en el 90% de los casos de muerte los pacientes sufrieron al menos un episodio de shock y el 82% de los casos de shock tuvieron un desenlace fatal (58, 71).

Aunque se ha producido una notable mejora en la aplicación de cuidados intensivos en pacientes con pancreatitis aguda grave, lo que ha reducido su mortalidad, el fallo orgánico temprano que provoca un deterioro irreversible, continúa siendo un desafío terapéutico. Recientes estudios avalan la significación del fallo orgánico temprano en esta enfermedad, con una extraordinaria alta mortalidad en aquellos pacientes que no responden al tratamiento conservativo (75, 59, 76).

1.6.2. Características hemodinámicas de la pancreatitis aguda

La pancreatitis aguda es una enfermedad que afecta directamente al sistema cardiovascular, varios estudios se han centrado en las características hemodinámicas de la pancreatitis tanto en modelos animales como en humanos. En los modelos animales las alteraciones hemodinámicas se producen inmediatamente después de la inducción la pancreatitis aguda, lo que no permite descartar el posible carácter transitorio de las mismas. Sin embargo, en las investigaciones hemodinámicas en humanos las variaciones tienen lugar varios días después del inicio de la enfermedad y, por lo tanto, ya no pueden ser consideradas alteraciones transitorias.

Tanto en pacientes con *pancreatitis aguda edematosa* como en aquellos con *pancreatitis aguda grave* la característica común es la hipovolemia. Sin embargo, en la *forma leve* los parámetros hemodinámicos (frecuencia cardíaca, resistencia vascular periférica total, diferencia de oxígeno arteriovenoso) se mantienen dentro del rango normal, mientras que en la *grave* la frecuencia e índice cardíaco se incrementan significativamente y la resistencia perivascular total es más baja, además la resistencia vascular pulmonar disminuye mientras que la fracción intrapulmonar se eleva. El estatus cardiovascular hiperdinámico se observa en fases tardías del episodio de pancreatitis aguda grave y la función hemodinámica se deteriora claramente con la progresión de la enfermedad. Aunque estos hechos concuerdan con los

resultados en modelos animales, aún no está claro si se deben a un cambio en el estado cardiovascular del paciente o si refleja el desarrollo de la necrosis pancreática o infección local (Tabla 1.6.2.) (77).

Tabla 1.6.2.: Incidencia del shock y otras complicaciones sistémicas en pacientes con pancreatitis aguda necrotizante (122)

	Necrosis estéril (%)	Necrosis infectada (%)
Insuficiencia pulmonar	57.9	72.9
Sepsis	32.4	56.5
Coagulopatía	36.2	54.1
Insuficiencia renal	21.3	21.2
SOC	22.9	29.4

1.6.3. Patogénesis del shock en la pancreatitis aguda

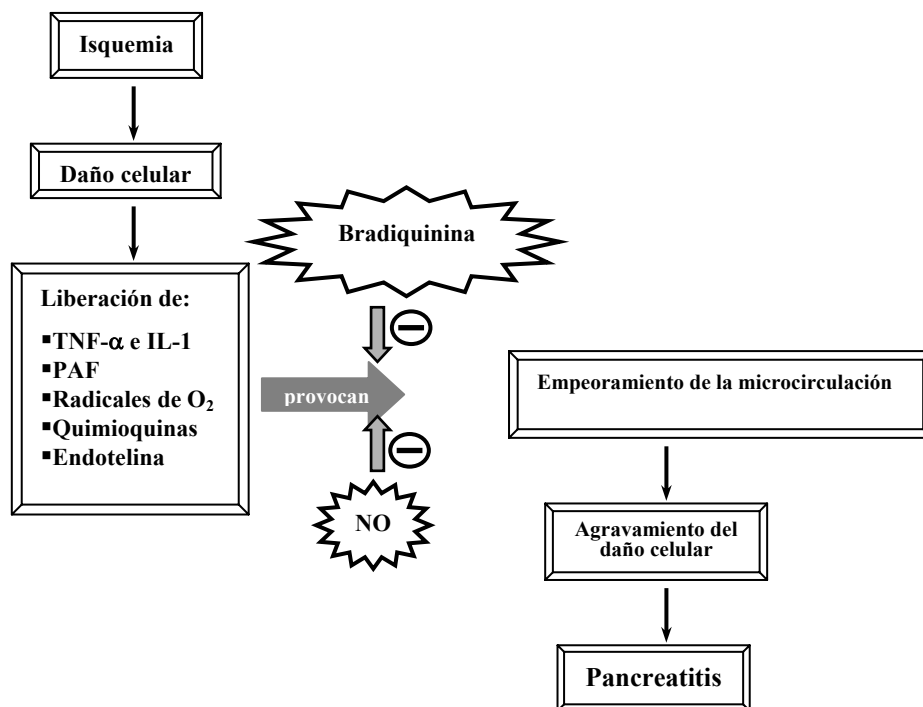
La pancreatitis aguda está relacionada con la liberación de una amplia variedad de mediadores y sustancias vasoactivas que afectan al sistema cardiovascular. La activación del sistema plasmático kinina-kalikreina, iniciado por la activación de la tripsina, parece jugar un papel clave en el mecanismo patofisiológico que lleva al estatus hemodinámico característico observado durante el curso de la pancreatitis aguda grave. La *bradiquinina* y los componentes del sistema de la kinina se detectan en plasma y líquido ascítico de animales tras la inducción de la pancreatitis, así como en la cavidad peritoneal de pacientes que sufren esta enfermedad. Además de los componentes del sistema kalikreina-kinina, la presencia de sustancias vasoactivas (histamina, serotonina y prostaglandinas) en el líquido ascítico y la liberación de mediadores inflamatorios de fase temprana (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α) responsables del daño endotelial, hipotensión y vasodilatación, juegan un importante papel en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares durante la enfermedad (77).

1.6.4. Shock pancreático y su patogénesis

Las observaciones del desarrollo de necrosis pancreática durante la pancreatitis aguda, como consecuencia de las alteraciones de la microcirculación pancreática, permiten especular con la función del shock como inductor de pancreatitis. La elevación transitoria de las enzimas pancreáticas en suero tras un trauma grave, isquemia o shock, pueden causar daño pancreático y apoyan la identificación del páncreas como un órgano de shock. Los mecanismos celulares más probables implicados en el desarrollo de la pancreatitis por shock apuntan a la combinación de mediadores inflamatorios y sustancias vasoactivas (Figura

1.6.4.) (77). El TNF- α , el factor activador de plaquetas, la endotelina, los radicales libre de oxígenos y varias quimioquinas disminuyen el aporte de sangre al páncreas ya sea por efectos vasoconstrictores o por daño vascular mientras que los donadores de oxido nítrico (NO) son capaces de disminuir estos efectos (ver sección 3.2, 3.3 y 3.5).

Figura 1.6.4.: Esquema del posible mecanismo patofisiológico que origina el daño pancreático durante el shock sistémico.
NO (óxido nítrico), PAF (factor de activación de plaquetas), TNF (factor de necrosis tumoral), IL (interleuquina)



1.7 Tratamiento

Los requerimientos asistenciales necesarios para el tratamiento de la pancreatitis aguda varían en función de la gravedad de la enfermedad. Casi una cuarta parte de los pacientes que ingresan con un cuadro clínico de pancreatitis aguda leve o moderada desarrollarán complicaciones posteriores y evolucionarán hacia la forma grave de la enfermedad, por lo tanto, un diagnóstico predictivo precoz es crítico en la elección del tratamiento adecuado.

En todos los casos de PA, el tratamiento médico esencial es la corrección de la hipovolemia, la restauración precoz del volumen mediante hidratación intravenosa previene las alteraciones en la microcirculación pancreática que desencadenan la isquemia y la necrosis características de la pancreatitis aguda grave. Ante un diagnóstico de *pancreatitis aguda leve* se recurre al control de la dieta y la administración de analgésicos para el control del dolor,

mientras que en la *pancreatitis aguda grave* es necesaria la asistencia nutricional, preferentemente por vía enteral, el tratamiento antibiótico en el caso de una necrosis infecciosa del páncreas, y la aplicación de procedimientos quirúrgicos (78, 79). La mayoría de los pacientes con PAG, que no presentan necrosis pancreática o que desarrollan necrosis estéril, pueden prescindir de la resección quirúrgica, aunque el tratamiento profiláctico con antimicrobianos ha demostrado tener efectos beneficiosos independientemente del grado e infección de la necrosis (80). Actualmente se estudian nuevos tratamientos basados en el control de los eventos desencadenantes de la patología, enzimas y mediadores inflamatorios.

1.7.1. Asistencia nutricional en pancreatitis aguda

Los pacientes con *PA Leve* suelen reiniciar la realimentación oral antes de una semana y no requieren asistencia nutricional, sin embargo, el tratamiento de los pacientes con *PA Grave* suele requerir intervención quirúrgica, con el consiguiente ayuno prolongado, y deben iniciar precozmente soporte nutricional.

La nutrición enteral presenta mas ventajas que la nutrición parenteral, la administración yeyunal precoz (sonda nasoyeyunal o yeyunostomía en el acto operatorio) no aumenta la secreción pancreática, es bien tolerada, no presenta efectos adversos y se asocia a una menor incidencia de complicaciones y eventos sépticos, además tiene mayores efectos beneficiosos en el índice APACHE II y la respuesta de fase aguda (81, 82). Únicamente la presencia de un íleo persistente o la imposibilidad de colocar la sonda nasoyeyunal correctamente harían recomendable el uso de nutrición parenteral.

1.7.2. Analgesia

El dolor es el síntoma más frecuente de la pancreatitis aguda y su control es un factor importante en el tratamiento. Los *antiespasmódicos* y los *analgésicos tradicionales*, o su combinación suelen ser suficientes para un adecuado control del dolor. Los *anti-inflamatorios no esteroideos* también son efectivos en el control del dolor pancreático, pero su uso prolongado conlleva efectos secundarios no deseados. Los *analgésicos opiáceos*, en bolo o infusión continua, son altamente eficaces especialmente “Petidina” y “Metadona” ya que no producen espasmo del esfínter de Oddi, sin embargo, la “Morfina” está contraindicada en pancreatitis por su efecto en el esfínter de Oddi.

1.7.3. Profilaxis antibiótica en pancreatitis aguda grave

La *infección de la necrosis pancreática* es un grave problema en la *PA Grave* que aumenta enormemente la tasa de mortalidad. La elección del tratamiento antibiótico adecuado debe tener en cuenta tres factores principales: el *espectro de acción*, el *grado de penetración* del páncreas y sus posibles *efectos tóxicos*.

En la actualidad se utilizan antibióticos de amplio espectro con adecuada penetración en páncreas que reducen la incidencia de infección de la necrosis, la incidencia de sepsis y la mortalidad de los pacientes (83, 84, 85). El conocimiento de los mecanismos involucrados en la infección, junto con las bacterias participantes, es fundamental en la elección y duración del antibiótico apropiado en la prevención de la necrosis pancreática.

La *penetración del páncreas* es un factor importante a la hora de elegir el antibiótico profiláctico, no obstante, la concentración en jugo pancreático no siempre representa la concentración tisular debido a que la presencia de edema pancreático puede aumentar la concentración tisular (**Tabla 1.7.3.**).

Tabla 1.7.3.: Clasificación de antibióticos según su penetración. CIM (concentración inhibitoria mínima)

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
Grado de penetración	Bajo No se alcanza la CIM para ninguna bacteria	Moderado Se alcanza la CIM para algunas bacterias	Alto Se alcanzan CIM superiores para bacterias sensibles
Antibiótico	Aminoglucósidos Ampicilina Cefalosporinas 1ª generación	Penicilinas de amplio espectro Cefalosporinas 3ª generación	Quinolonas Carbapemenes Metronidazol

Los antibióticos mas utilizados, carbapemenes, cefalosporinas 3ª generación y quinolonas tienen un *amplio espectro de acción* pero no tienen acción significativa sobre el enterococo y, con excepción de los carbapemenes, no dan cobertura anaeróbica completa. Sin embargo, el enterococo y los microorganismos anaerobios juegan un papel secundario en la infección de la necrosis, y por lo tanto, estos fármacos cuentan con una buena eficacia (83, 84).

Algunos fármacos cumplen los requisitos en cuanto a espectro y grado de penetración aceptable pero tienen *efectos tóxicos*, la “Ceftriaxona” tiene un espectro adecuado y una penetración aceptables pero puede producir litiasis biliar.

Una alternativa al uso profiláctico de antibióticos lo constituye la *descontaminación selectiva del tubo digestivo* pero, aunque se ha demostrado una disminución de la tasa de infección pancreática y de la mortalidad (86), existe la probabilidad de infección por bacterias gram + multiresistentes (87).

1.7.4. Otras medidas en el manejo de la pancreatitis grave no infectada

- Reanimación precoz e intensiva, con restauración de volumen y apoyo circulatorio mediante catéter urinario y acceso venoso, reduce el riesgo de fallo orgánico precoz, causa principal de la morbilidad y mortalidad (88, 89).
- Monitorización y tratamiento adecuado de variables hemodinámicas (presiones de llenado, débito cardíaco, transporte y consumo de oxígeno) mediante un catéter de Swan Ganz.
- Evitar la nutrición parenteral, en los pacientes que requieren asistencia nutricional utilizar el tubo digestivo (81).
- Seguimiento de la evolución de la respuesta inflamatoria sistémica y control de la tomografía de abdomen frente al empeoramiento clínico y alteración de los parámetros de laboratorio.

1.7.5. Tratamiento de la patología biliar

➤ *Pancreatitis aguda leve*: la tasa de recurrencia tras un primer episodio de PA biliar oscila entre un 25-63%, dependiendo del tiempo transcurrido, si no se practica una colecistectomía. La técnica utilizada es la colecistectomía laparoscópica con colangiografía intraoperatoria, y habitualmente se practica durante el periodo de ingreso hospitalario, tras el cese de la sintomatología, entre 7-10 días desde el comienzo del ataque. Si hubiera complicaciones locales como pseudoquistes en formación o necrosis del parénquima la colecistectomía tendrá lugar tras la resolución completa de las complicaciones (90, 91, 89). Ante la evidencia de coledocolitiasis se debe practicar una colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (ERCP) con esfinterotomía endoscópica (EE) para extraer los cálculos (89). La EE puede ser una opción terapéutica segura, frente a la colecistectomía, para la prevención de ataques recurrentes en pacientes con PA biliar seleccionados (65).

➤ *Pancreatitis aguda grave*: en la PA Grave la ERCP y EE esta indicada en los casos con ictericia y/o colangitis y debe practicarse dentro de las primeras 48 horas del ingreso. La práctica urgente de estas técnicas quirúrgicas se asocia a menor incidencia de complicaciones

y reducción de la mortalidad, sin embargo, si los cálculos no son obstructivos no esta demostrado el beneficio de la extracción endoscópica (92, 93).

En ausencia de dilatación de la vía biliar o de alteraciones bioquímicas sugerentes de origen biliar de la pancreatitis, la ERCP no esta indicada (88).

1.7.6. Pancreatitis post-ERCP

La ERCP y EE son las técnicas quirúrgicas más utilizada para localizar y extraer los cálculos que obstruyen los conductos biliares y son la causa más frecuente de PA, pero en un bajo porcentaje que oscila entre el 1-14%, pueden desencadenar un nuevo episodio de PA por traumatismo directo de las vía biliares y pancreáticas. Aunque la frecuencia de la pancreatitis inducida por EE es mayor que la pancreatitis post-ERCP, la posibilidad de desarrollar una PA grave en las siguientes 48 horas o de sufrir empeoramiento de los síntomas tras 48 horas es menor, además la menor presión intraductal durante el procedimiento reduce la gravedad de la PA.

Los *factores mecánicos* son la principal causa de la PA-post-ERCP. La *canulación de la papila* provoca el espasmo del esfínter de Oddi y/o del edema de la papila que obstruye el flujo del jugo pancreático y desencadena la inflamación pancreática aguda. La *inyección a presión* del líquido de contraste o de otros fluidos durante la ERCP contribuye al daño del epitelio del conducto y de las células acinares, y puede producir *acinarización*, un proceso que tiene lugar cuando el volumen inyectado en el conducto pancreático excede la capacidad del conducto y se redistribuye en los espacios intersticiales dañando directamente las células acinares. Además de los factores mecánicos, también hay que tener en cuenta el daño acinar provocado por los *factores químicos*, como el yodo presente en el líquido de contraste, los *factores enzimáticos* y *microbiológicos* debido a las enzimas intestinales activadas y las bacterias, respectivamente, que pueden penetrar por la manipulación de los conductos, y los *factores fisiológicos* relacionados con anormalidades anatómicas de las vías biliares y pancreáticas, y defectos genéticos de las enzimas neutralizadoras de la tripsina como la $\alpha 1$ -anti-tripsina (94).

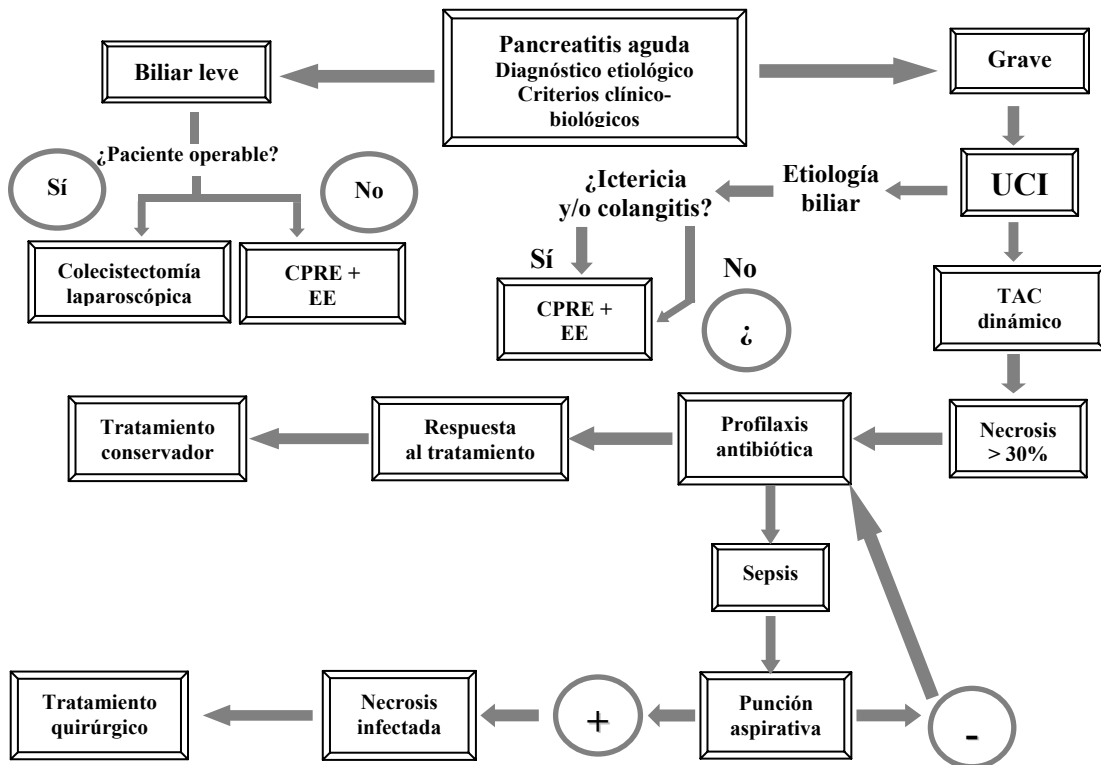
1.7.7. Tratamiento de la infección pancreática

Los factores más importantes implicados en la infección de la necrosis pancreática son la extensión de la necrosis y la duración del proceso inflamatorio pancreático. Una vez demostrada la infección del tejido necrótico, por presencia de burbujas aéreas mediante TC y

de contaminación mediante punción aspirativa, debe aplicarse tratamiento quirúrgico urgente. (95, 96). Se extraen los tejidos desvitalizados y/o infectados pancreáticos o peripancreáticos, preservando el tejido sano, y se lava exhaustivamente la celda pancreática, la cavidad abdominal y el retroperitoneo (88). Tras la resección del tejido dañado, es necesario la instalación de drenajes adecuados o de laparostomía contenida para la extracción del tejido necrótico que se vaya formando posteriormente, la aplicación de lavados pancreáticos, y el tratamiento de complicaciones como fistula o hemorragia (96). Las técnicas mas utilizadas son el *lavado-irrigación continuo*, a través de tubos de drenaje colocados en la celda pancreática y retroperitoneo, propuesto por Berger, y la *técnica de empaquetado* con reaperturas programadas (laparotomía) descrita por Bradley (97).

Paralelamente al drenaje de los tejidos infectados, se aplican las medidas de reanimación y apoyo de órganos y el tratamiento antibiótico específico dirigido a los agentes infecciosos aislados de muestras obtenidas por punción o cirugía. Los antibióticos deben utilizarse en dosis altas para asegurar las concentraciones tisulares requeridas.

Figura 1.7.7.: Estrategia terapéutica en Pancreatitis aguda



1.7.8. Terapias de utilidad potencial en pancreatitis aguda

Inhibir la secreción enzimática por un lado, y bloquear las enzimas activadas y mediadores inflamatorios por otro, son puntos clave en el desarrollo de futuras terapias que reduzcan la necesidad de realizar intervenciones quirúrgicas.

➤ Inhibidores de proteasas: estos fármacos antagonizan la tripsina pancreática activada lo que, teóricamente, podría afectar positivamente a la evolución del proceso local de autodigestión y necrosis, y reducir la inflamación sistémica. Un meta-análisis reciente que incluye datos procedentes de diez protocolos realizados en las últimas 4 décadas, muestra una reducción significativa del ratio de mortalidad en pacientes con pancreatitis aguda moderada o grave (98).

◆ *Atropina*: su administración en dosis altas afectaba al balance proteasas – antiproteasas (99) y la activación del complemento (100), pero no era reproducible y el beneficio clínico no fue demostrado.

◆ *Gabexatomesilato (FOY)*: tiene mayor potencia, baja antigenicidad, mayor espectro antagónico enzimático y mayor penetración celular (101). Reduce significativamente las complicaciones sin modificar la mortalidad y puede ser una terapia preventiva efectiva de la PA post-ERCP, sin embargo, los resultados no avalan suficientemente su aplicación como terapia definitiva (102).

◆ *Inhibidor del tripsinógeno urinario (UTI, Ulinastatina)*: los estudios realizados en pacientes y modelos experimentales muestran resultados prometedores en la prevención del daño local y sistémico en la PA. En pacientes sometidos a ERCP, la administración profiláctica en tiempos cortos disminuye la incidencia de la pancreatitis aguda y la hiperenzinemia (103), y en un modelo experimental de rata, la inyección intraperitoneal posterior a la inducción de la PA reduce la degradación del tejido pancreático y los niveles de amilasa y lipasa (104). Por otro lado, en un modelo experimental knock-out para UTI se observa un incremento de la inflamación sistémica puesta de manifiesto por el aumento de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, evidenciando el posible efecto protector de este inhibidor frente al desarrollo de complicaciones en la PA (105).

◆ *Nafamostat*: es un inhibidor de proteasa comúnmente utilizado en combinación con antibiótico y mediante infusión arterial continua para controlar la PAG y evitar en lo posible la necesidad de operación (106, 107). Los resultados son prometedores y los estudios

recientes en modelos experimentales también muestran una alta efectividad en la reducción de la necrosis pancreática y ratio de mortalidad, aunque la concentración del fármaco en pulmón y páncreas y sus efectos difieran con la ruta de administración (108).

◆ *SPINK1*: la aplicación terapéutica del propio inhibidor endógeno de la tripsina constituye una de las vías más novedosas en el tratamiento de la PA. En un modelo experimental transgénico de ratón, la inducción de la producción de SPINK1 aumentó en un 190% los niveles de proteína en células acinares y redujo significativamente la gravedad histológica de la enfermedad aunque no la activación del tripsinógeno (109).

➤ *Inhibidores de la secreción pancreática*: uno de los objetivos del tratamiento de la pancreatitis aguda es la obtención del reposo pancreático conseguido principalmente mediante el ayuno. Los primeros fármacos experimentales como atropina, glucagon, calcitonina o bloqueantes H₂, que inhiben la liberación de secretina, no mostraron efectos beneficiosos en la evolución de la pancreatitis. Actualmente los estudios clínicos se centran en la *somatostatina* o su derivado, el *octreotide*, ambos agentes son potentes inhibidores de la secreción exocrina del páncreas, tienen efectos antiinflamatorios y citoprotectores. La somatostatina inhibe la secreción de IL6 inducida por TNF α (citoquinas pro-inflamatorias) en miofibroblastos periacinares e induce la apoptosis de las células acinares reduciendo la reacción inflamatoria, además relaja el esfínter de Oddi evitando el espasmo y la obstrucción del flujo pancreático (110). Sin embargo, los efectos del octreotide son más moderados observándose una reducción transitoria de los niveles de IL6 sérica en pacientes con PAL (111). No obstante, los resultados son controvertidos, aunque algunos estudios clínicos han demostrado una reducción de la mortalidad y de la frecuencia de PA post-ERCP (102, 112, 113), otros no aportan evidencia suficiente como para recomendar su uso (114).

➤ *Antagonistas de PAF (Lexipafant)*: varios estudios esperanzadores demostraron que el “Lexipafant”, un potente antagonista del factor activador plaquetario (PAF) disminuía los niveles de mediadores inflamatorios y contribuía a la recuperación del fallo orgánico en pacientes con pancreatitis aguda (115, 116), sin embargo, un extenso estudio más reciente no encontró mejoría significativa de estos pacientes (117). No obstante, la investigación de los efectos de este fármaco en modelos experimentales murinos ha proporcionado resultados más prometedores (118).

➤ Moduladores del metabolismo del óxido nítrico: el óxido nítrico (NO) es un producto implicado directamente en los procesos isquémicos relacionados con las alteraciones de la microcirculación causantes del daño pancreático. Los moduladores del metabolismo del NO, fundamentalmente aquellos que regulan la función de la óxido nítrico sintasa constitutiva e inducible, así como la presencia de NO exógeno y endógeno durante el desarrollo de la PA, son actualmente uno de los campos de estudio cuya finalidad es el control de los daños irreversibles en el páncreas y su proyección hacia otros órganos (ver apartado 3.5).

➤ Citoquinas y mediadores anti-inflamatorios: numerosos estudios han demostrado el alto valor predictivo de gravedad de las citoquinas, principalmente proinflamatorias, en la PA, y su implicación en el desarrollo de complicaciones como el fallo respiratorio. Por ello, las nuevas terapias se centran cada vez más en la utilización tanto profiláctica como terapéutica de citoquinas anti-inflamatorias o sus análogos, siendo la IL10 la que ofrece resultados más prometedores (ver apartado 3.3.2). También se estudia la aplicación terapéutica de otros inmunomoduladores con propiedades anti-inflamatorias como la inosina, un nucleósido resultante del metabolismo de la adenosina que tiene efecto profiláctico en la reducción de la gravedad de la pancreatitis aguda medida por factores séricos e histológicos (119).

2. SISTEMA INMUNE

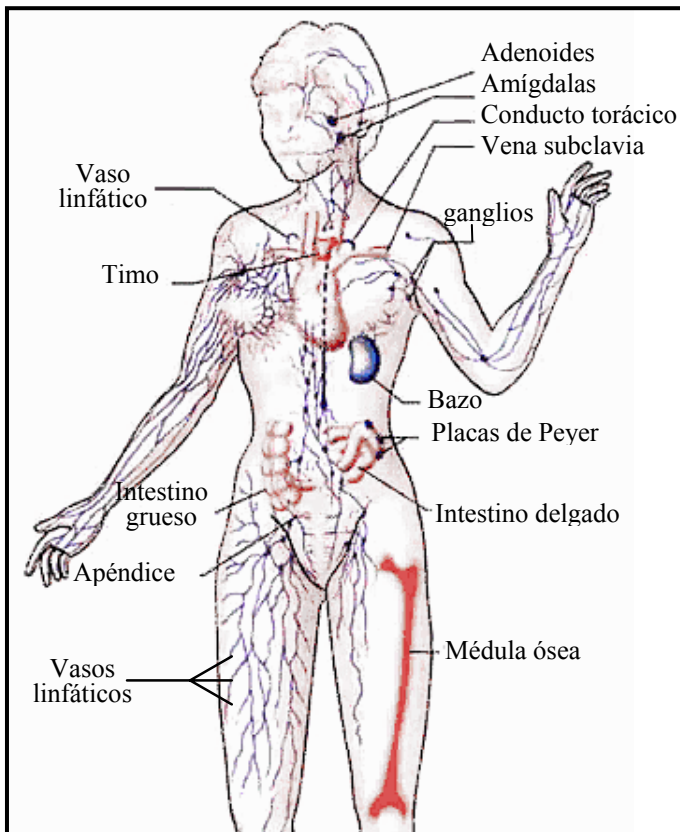
El sistema inmune constituye una compleja red estructural y funcional cuyo principal objetivo es **discriminar lo propio de lo extraño**, y en el que están implicados una amplia variedad de células y tejidos dirigidos y coordinados por diferentes moléculas. La característica biológica esencial del sistema inmune es el **reconocimiento específico** mediante constantes interacciones de sus componentes y los restantes componentes del organismo con elementos extraños que puedan penetrar en el cuerpo humano (120). Durante el desarrollo embrionario se establece el reconocimiento de lo propio, todos aquellos componentes que entran en contacto con el sistema inmune en desarrollo son incorporados al sistema de reconocimiento generando un estado de tolerancia o provocando su eliminación.

El sistema inmune está formado por **órganos linfoides primarios y secundarios** en los cuales se generan, seleccionan y adquieren su función las células implicadas en la respuesta inmune (121).

➤ Órganos linfoides primarios o hematopoyéticos: su función principal es la generación de componentes celulares del sistema inmune durante toda la vida del individuo. Los principales órganos son la *médula ósea*, donde se generan los precursores hematopoyéticos que posteriormente se diferenciarán en el resto de componentes celulares, y el *timo*, donde migran los precursores de células T para sufrir el proceso de diferenciación y selección que originará las diferentes subpoblaciones de células T maduras. Durante la vida fetal y en situaciones de stress durante la vida adulta (quimioterapia) el *hígado* actúa como órgano hematopoyético.

➤ Órganos linfoides secundarios: forman una extensa red por todo el organismo a través de la cual circulan las células maduras del SI, entran en contacto con los posibles agentes extraños (antígenos) y sufren los procesos de selección, activación y proliferación necesarios para establecer la respuesta inmune. Los principales órganos linfoides secundarios son los ganglios linfáticos, cadenas de nódulos paralelos a las principales vías circulatorias, y el bazo, ambos órganos están muy vascularizados y son ricos en células del SI agrupadas en formaciones específicas denominadas folículos, actúan como filtros de posibles antígenos y los retienen hasta la llegada de células compatibles. El resto de órganos secundarios lo forman agrupaciones de células asociadas a mucosas (MALT), principalmente la *piel*, y a tubo digestivo (GALT), que engloba las *amígdalas*, las *placas de Peyer* y el *apéndice*, son zonas en contacto directo con el exterior y por lo tanto constituyen la primera línea de defensa contra componentes extraños.

Figura 1: Órganos linfoides primarios y secundarios



Los **componentes celulares** del SI son los *linfocitos*, agrupados en linfocitos T, linfocitos B y células NK, y las *células accesorias*, entre las cuales se incluyen células fagocíticas como monocitos/macrófagos y neutrófilos, células dendríticas, células de Kupffer y células de Langerhans (122). Los linfocitos son células efectoras y necesitan de la colaboración de las células accesorias para su activación y regulación, estas células entran en contacto con el antígeno, lo procesan y lo presentan a los

linfocitos cuando recirculan por los órganos linfoides secundarios, por ello también se denominan *células presentadoras de antígeno* (APC). Sin embargo, la división entre células efectoras y células accesorias no es tan clara, ya que los linfocitos B son células presentadoras de antígeno y los macrófagos tienen funciones efectoras.

La comunicación entre los diferentes componentes del SI se establece mediante moléculas solubles secretadas tanto por las células efectoras como por las células accesorias, el **componente molecular** lo forman el sistema del complemento, las inmunoglobulinas (Igs), las citoquinas y las quimioquinas (123).

2.1. Sistema principal de histocompatibilidad (MHC).

La identidad de las células de cada individuo reside en un grupo de moléculas expresadas en la membrana citoplasmática de las células nucleadas denominadas *moléculas de histocompatibilidad*, en estas moléculas reside la función de reconocimiento específico del SI (124). Los genes que codifican estas moléculas son altamente polimórficos y se encuentran en el *Sistema principal de histocompatibilidad* en el cromosoma 6. Dependiendo de su distribución tisular, estructura bioquímica y propiedades funcionales existen dos clases de moléculas: MHC clase I y MHC clase II.

➤ MHC clase I: se expresa en todas las células nucleadas del organismo y parte de los genes que la codifican se localizan en los loci A, B y C del MHC en el cromosoma 6. Están formadas dos cadenas polipeptídicas, una pesada o *cadena alfa* (45 Kd) y una cadena ligera o β_2 -microglobulina (12 kd), codificada en el cromosoma 15 (125, 126). Los dominios globulares α_1 y α_2 de la cadena pesada son *polimórficos* y determinan la *aloantigenicidad*, es decir, son diferentes para cada individuo dentro de la propia especie, mientras que el **resto de la cadena α y β_2 -microglobulina** son *monomórficos*, idénticas para todos los individuos de una misma especie. Estos antígenos de clase I se denominan en el ser humano antígenos *HLA-A, B y C* y sirven como estructuras de reconocimiento para células efectoras con función citotóxica mediante contacto célula-célula, linfocitos CD8+ y células NK.

➤ MHC clase II: en condiciones fisiológicas estas moléculas son exclusivas de las células del SI y se expresan en los linfocitos B, los linfocitos T activados, las células presentadoras de antígeno y en los precursores inmaduros hematopoyéticos (células CD34+). Son codificadas por el locus D del MHC y están formadas por dos cadenas polipeptídicas distintas, *cadena α* (32Kd) y *cadena β* (28Kd) compuestas cada una de ellas por dos dominios globulares, α_1/α_2 , y β_1/β_2 . La variabilidad de la secuencia de aminoácidos responsable del polimorfismo reside principalmente en la cadena α aunque también podría participar la cadena β . Existen tres familias de antígenos de clase II, denominadas *HLA-DR, DP y DQ* (127).

Cluster de Diferenciación (CD)

El desarrollo de **anticuerpos monoclonales (AcMo)** que reconocen proteínas específicas en la membrana celular nos permite la clasificación de los linfocitos y su caracterización funcional, que se extiende a otras estirpes celulares. A cada anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína o “marcador” y que identifica, un subconjunto particular, una determinada función o un estadio de diferenciación, se le aplica una designación “**CD**” (*Cluster of Differentiation*), a la que se llega por consenso en las conferencias internacionales realizadas al efecto. Utilizaremos aquí la nomenclatura de la última reunión internacional, “**7th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens**” en Harrogate, Reino Unido, 2000 (*Leukocyte Typing VII, Oxford University Press*).

2.2. COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE

2.2.1. Linfocitos T

Estas células maduran y se diferencian en el timo del cual reciben su nombre (128), y constituyen el 70-75% de los linfocitos de sangre periférica (129). Aunque tradicionalmente se les identificó por su capacidad de formar rosetas con los hematíes de carnero, en la actualidad su identidad viene definida por la expresión clonal en su membrana citoplasmática de receptores específicos (TCR) (130). Los linfocitos T, a diferencia de los B, se caracterizan por reconocer antígenos (Ags) asociados a moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) expresadas por APCs. Tras el reconocimiento antigénico se produce la activación del linfocito y su transformación en célula efectora cuya función estará determinada por el microambiente inmunológico. En la membrana del linfocito T encontramos una amplia variedad de moléculas implicadas en el *reconocimiento específico del complejo MHC-Ag* (heterodímeros α/β y γ/δ , CD4 y CD8), en la *respuesta efectora* desencadenada por el reconocimiento (CD3 y otras) y en la transducción de señales mediante en el contacto célula-célula que modulan el tipo de respuesta y regulan su recirculación, *marcadores de linaje*, *moléculas de adhesión*, *marcadores de activación* y *moléculas coestimuladoras* (131).

➤ Receptor antigénico de células T (Ti): es un heterodímero compuesto por 2 cadenas glicoproteicas unidas por puentes disulfuro (s-s), hay cuatro tipos de cadenas que diferencian dos poblaciones, los linfocitos T α/β (90% de los linfocitos T de sangre periférica) y los linfocitos T γ/δ (10% restante). Cada cadena está formada por una porción extracelular, con dominios constantes (C) y variables (V) y una cola corta intracitoplasmática (132, 133, 134). Determinados péptidos de las regiones hipervariables de ambas cadenas α y β , codificadas por los segmentos génicos V, D, y J, interaccionan con otros péptidos del complejo MHC-Ag, (135, 136). Cada clon de linfocitos T posee una secuencia de aminoácidos propia en la región variable pero idéntica para todos los miembros del clon dando lugar a una identidad biológica. La restricción de MHC I o MHCII no viene determinada por los genes codificantes para el receptor Ti (131).

➤ Complejo CD3: el complejo se asocia no covalentemente al receptor Ti permitiendo su expresión en membrana y transduciendo la señal una vez producida el reconocimiento del Ag por el TCR (131, 137). Está formado por 6 cadenas protéicas agrupadas en 3 dímeros unidos mediante asociaciones no covalentes, dos heterodímeros

extracitoplásmicos que flanquean al receptor T η , ϵ/γ y ϵ/δ (cadena γ 25-28 kD, cadena δ 20 kD, cadena ϵ 20 kD) y un homodímero intracitoplásmico, $\zeta\zeta$ (cadena ζ 16 kD) que en el 10% de los linfocitos sería un heterodímero ($\zeta\eta$ cadena η 21 kD) y podría estar relacionado con una función diferente de estas células (137,138, 139).

➤ Correceptores: los linfocitos T maduros se agrupan en dos grandes subpoblaciones definidas por la expresión en membrana de moléculas CD4 o CD8 y asociadas tradicionalmente a funciones de cooperación (linfocitos T CD4⁺ colaboradores) y de citotoxicidad y/o supresión (linfocitos T CD8⁺ citotóxicos) (140). Actualmente se sabe que ambas subpoblaciones pueden realizar ambas funciones pero en la mayoría de los casos se mantiene dicha correlación funcional (141).

CD4: se expresa en el 65% de los linfocitos T α/β ⁺ de sangre periférica y otros componentes del SI como timocitos, monocito/macrófagos y células dendríticas (208). Determina la restricción para MHCII al que se une para estabilizar la unión linfocito T-célula APC (sinapsis inmunológica) y colaborar en la transducción de las señales emitidas por el TCR mediante su asociación a proteín-tirosín quinasas ($p56^{lck}$), además su unión a moléculas de MHC mantiene la supervivencia de los linfocitos T CD4⁺ naïve independientemente del reconocimiento antigénico y en combinación con la señal emitida por la unión del TCR induce la proliferación homeostática de esta población (142, 143, 144).

CD8: se expresa en el 35% de los linfocitos T α/β ⁺ como homodímero (CD8 α) o hetero/multidímero (CD8 α -CD8 β) (141) y determina la restricción para MHCI (145). Las células NK también expresan bajos niveles del homodímero CD8 α (146). Al igual que en el caso del correceptor CD4, la unión del CD8 a las moléculas del complejo MHC, estabiliza la unión TCR/MHC-Ag y amplifica el estímulo generado transduciendo o colaborando en la transducción de la señal gracias a los sitios de fosforilación en su cola citoplásmica (142, 143, 144, 147).

2.2.2. Linfocitos B

Constituyen el 10-15% de los linfocitos de sangre periférica, maduran en la médula ósea aunque su nombre viene dado por la “bursa de Fabricio”, centro de maduración de linfocitos T en aves (123). Se caracterizan por la expresión en membrana del receptor de células B (BCR) cuyo componente principal son las inmunoglobulinas de membrana (mIg) que funcionan como receptores de Ags y por la expresión de determinados correceptores de los

cuales el CD19 y el CD20 identifican fenotípicamente a la población (129, 148). El reordenamiento de los genes que codifican las mIgs es único para cada célula B dando lugar a un clon que produce un anticuerpo específico (Igs secretadas), el reconocimiento del Ag por la mIg desencadena la maduración y diferenciación de la célula en célula plasmática secretora de Igs (149, 150).

➤ Receptor de células B (BCR): es un complejo formado por la inmunoglobulina de membrana (mIg) responsable del reconocimiento antigénico y un heterodímero, $Ig\alpha/Ig\beta CD79$, que controla el ensamblaje del BCR en membrana y la maduración de la célula B, y transduce la señal tras la estimulación por el Ag (151-153). Las **inmunoglobulinas** están formadas cuatro cadenas polipeptídicas, 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L) con regiones constantes (C) y variables (V) en ambas. La región constante o *isotipo* es común para todos los miembros de la especie y define la función biológica (activación del complemento, unión a receptores específicos FcR en células del SI, migración a través de mucosas y placenta...), cada isotipo se asocia a una función. La región variable o *idiotipo* es única para cada clon de células B y define la función inmunológica (reconocimiento antigénico) (154), la casi infinita variabilidad que permite el reconocimiento de cualquier Ag se obtiene mediante el reordenamiento génico de las regiones variables de ambas cadenas (V_H, J_H, V_L, J_L y D), la hipermutación somática y las diferentes asociaciones de cadenas pesadas y ligeras (135, 155, 156).

➤ Correceptores: al igual que en los linfocitos T, en la superficie de los linfocitos B se expresan una serie de moléculas accesorias, muchas de ellas comunes a ambas poblaciones linfocitarias y a otras células del SI, que actúan como *correceptores* (**Tabla 2.2.2.**), *moléculas de adhesión y recirculación* y *moléculas coestimuladoras* que regulan la actividad del linfocito B como célula efectora y colaboran estrechamente en la interacción con otros componentes celulares y moleculares del SI (158-160).

CD19: pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y define fenotípicamente a la población de linfocitos B. Comienza a expresarse en estadios de célula pro-B y pre-B durante el desarrollo en médula ósea donde juega un papel clave en la regulación del proceso (161), contribuye a la transducción de la señal inducida por la unión mIg-Ag mediante la activación de la cascada de las proteín-quinasa por los residuos fosforilados de su cola

citoplásmica (158, 162, 163), pero se pierde en el paso a célula plasmática junto con el CD20 y el CD22 (164).

Tabla 2.2.2.: Correceptores de células B

Correceptor	Estructura	Célula que lo expresa	Ligando	Función
CD19	Superfamilia de Igs	Células B, CD foliculares	-	Regulación del desarrollo de células B, transducción de señales durante la activación celular (158, 160-164)
CD20	Fosfoproteína no glicosilada	Células pre-B, células B naïve y activadas.	-	Regulación de la activación y el crecimiento celular, amplificación de la cascada de señalización mediante la formación de canales de Ca ²⁺ (165)
CD21	Proteína de control de complemento	Células B maduras, CD foliculares, células epiteliales y subpoblación de timocitos (166)	Fragmento C3d del complemento, CD23, IFN α (167, 168)	Activación de la célula B a bajas concentraciones de Ag (169), junto con el CD19 forma un complejo implicado en la respuesta inmune innata mediada por complemento (170, 171).
CD22	Superfamilia Igs	60-80% de células B maduras mIg+	Glicoconjugados de subpoblaciones de linfocitos T (mayor afinidad), monocitos y linfocitos B (162)	Limita o inhibe la señal dependiente de CD19, generada por la unión del Ag al BCR, mediante el reclutamiento de fosfotirosín y fosfoinositol fosfatasas (SHPI, SHIP) (163, 169)
CD23	Lectina tipo C	Células B maduras, células plasmáticas, monocitos/macrófagos, eosinófilos, plaquetas y CD (172)	Ig E (receptor de baja afinidad) (173)	Aumento de la eficacia del procesamiento del Ag y su presentación mediante la unión a inmunocomplejos Ag-IgE, e incremento de células B en los folículos (diferenciación y maduración de células B) (173-175)

CD: célula dendrítica

Célula pre-B: estadio del desarrollo de células B donde tiene lugar el transporte a membrana de una IgM no definitiva con pseudocadenas ligeras.

2.2.3. Células NK

Las células NK engloban una población heterogénea de linfocitos con actividad citotóxica capaces de detectar y lisar células tumorales o infectadas por virus independientemente del reconocimiento antigénico, de ahí el nombre de “natural killer” (asesinos naturales) (176, 177). Constituyen entre 5 y el 15% de los linfocitos de sangre periférica, derivan principalmente de linfocitos granulares grandes (LGL), poseen núcleo arriñonado y gránulos en el citoplasma (178). Estas células no contienen reordenaciones productivas de los genes de TCR (cadena β de del receptor Ti) pero establecen un reconocimiento de MHCI no asociado a Ag mediante dos familias de receptores, *KIR* (receptores de la superfamilia de las Igs) que reconocen HLA-A,B y C, y *CD94* y *NKG2A* (receptores de la superfamilia de las lecitinas tipo

C) que reconocen HLA-E (179-181). La ausencia de MHC, característica de células infectadas por virus o células tumorales, desencadena la respuesta citotóxica, mientras que su expresión induce una señal supresora que inactiva la célula (182-185). La excepción a esta regla la constituyen las células dendríticas inmaduras (iDC), las cuales pese a expresar moléculas MHC I en su superficie son lisadas por células NK autólogas; sin embargo una vez que maduran tras su exposición a antígenos, en el contexto de una respuesta inmune a patógenos, se vuelven resistentes a la lisis mediada por células NK y se convierten en potentes estimuladoras de la activación y proliferación de estas células (186, 187). Fenotípicamente se caracterizan por la ausencia de CD3 y la expresión de dos receptores, CD56 (reconoce grupos heparán sulfato) y CD16 (Receptor IIIa de región constante de IgG) (188) presentes también en otros tipos celulares con actividad citotóxica como monocitos/macrófagos y algunos linfocitos T activados. Estas células también expresan *moléculas de adhesión* (CD62L), *quimiorreceptores* (CXCR3, CCR7, CXCR1 y CX₃CR1) y *marcadores de activación* (CD25 y CD122) comunes a otras poblaciones linfocitarias, además son una de las principales poblaciones productoras de citoquinas y expresan de forma constitutiva receptores para numerosas monoquinas (citoquinas producidas por monocitos) lo que las convierte en una subpoblación clave en la regulación de la respuesta inmune (189).

CD16 (FcγRIII): es el receptor de baja afinidad de la región constante de la IgG, permite el reconocimiento y la unión a células diana recubiertas de Igs (opsonizadas) y dirige la actividad citotóxica mediada por anticuerpo (Ig), ADCC (189).

CD56 (N-CAM): es una molécula de adhesión, localizada inicialmente en células neurales, cuya función esta probablemente relacionada con las interacciones entre la célula NK y la célula diana. La intensidad de expresión de esta molécula define fenotípicamente y funcionalmente dos subpoblaciones de células NK: la mayoría de las células NK (90%) son *CD56^{dim}* (baja/media intensidad) y coexpresan CD16 con alta intensidad, se encuentran preferentemente en órganos linfoides periféricos, tienen alta actividad citotóxica ADCC y baja producción de citoquinas; por el contrario las *CD56^{bright}* (alta intensidad) son minoritarias (10%), no suelen expresar CD16, se localizan en ganglios linfáticos, tienen baja capacidad citotóxica y alta producción de citoquinas (IFN γ , TNF β , IL10, IL3, GM-CSF) (189, 190).

2.2.4. Células presentadoras de antígeno (APCs)

Las *células presentadoras de antígeno profesionales (APCs)* o *células accesorias* constituyen un heterogéneo grupo de células cuya función principal, dentro de la respuesta inmune adaptativa o específica, es la presentación del antígeno en el contexto de moléculas MHC II, y la emisión de señales coestimuladoras que activan a los linfocitos T y los capacitan para desarrollar sus funciones de reconocimiento y eliminación de antígenos. Además de su función directa como células presentadoras, las células accesorias cooperan entre sí y con los linfocitos en la regulación de la respuesta inmune mediante la producción de citoquinas y quimioquinas. Las principales poblaciones de APCs en orden decreciente de efectividad en la presentación antigénica son *células dendríticas (DC)*, *monocito/macrófagos* y *células B* (191). La unión de la APC y el linfocito T es un proceso complejo conocido como *sinapsis inmunológica* mediante el cual el linfocito “repta o se arrastra” sobre la APC estableciendo múltiples y cortos contactos durante los cuales tienen lugar las interacciones recíprocas esenciales para la activación o inhibición de los linfocitos T dependiendo de su misión dentro de la respuesta inmune (192, 193).

➤ **Macrófagos:** son células con capacidad fagocítica de amplio espectro que incluye microorganismos, componentes microbianos, elementos extraños, y células o componentes celulares derivados de procesos necróticos y apoptóticos, se distribuyen por todo el cuerpo y su morfología varía dependiendo del tipo de tejido al que se asocian (191, 194). Poseen receptores que reconocen componentes microbianos (lipopolisacárido, LPS; ácido lipoteicoico, LTA; petidoglicanos, ADN no metilado), los receptores TLR4 (reconoce LPS) y TLR2 (reconoce LTA), pertenecientes a la familia de los receptores Toll, son dos de los más importantes (194), además de receptores para la región Fc de las Igs implicados en el reconocimiento y posterior fagocitosis de patógenos mediante procesos de opsonización (195). La activación de la célula a través de estos receptores desencadena una respuesta efectora dentro de la respuesta inmune innata mediada por *componentes celulares*, acción microbicida mediante generación de radicales libre de oxígeno (OH-, O₂-) y óxido nítrico (NO-), y secreción de enzimas y mediadores lipídicos derivados de prostaglandinas; y por *componentes humorales*, producción de citoquinas y reactantes de fase aguda, y activación del complemento (196). En la respuesta inmune adaptativa o específica los macrófagos son APCs profesionales con efectividad media en la presentación de Ags en el contexto de MHC II a linfocitos T, sin embargo, son grandes células efectoras que secretan una amplia variedad de citoquinas (IL-1, IFN γ y TNF α) y

quimioquinas tras la activación recíproca con el linfocito T (196). Las citoquinas y quimioquinas secretadas reclutan y activan nuevos linfocitos y otras células del sistema inmune, generando un proceso de amplificación muy importante en la respuesta inmune específica (197).

➤ **Células dendríticas:** son las APCs más especializadas, capaces de presentar el Ag con alta eficacia a los linfocitos induciendo su activación y proliferación en unos casos o su anergia y delección clonal por apoptosis en otros, dependiendo de las señales coestimuladoras emitidas por los linfocitos. Al igual que los macrófagos engloban subpoblaciones bien diferenciadas asociadas a determinadas localizaciones. Una de las subpoblaciones de DCs mas importantes son las *células de Lanhgerhans*, presentes mayoritariamente en los epitelios, y cuya función primordial es la captación de partículas extrañas o patógenas, fundamentalmente por pinnocitosis, para luego migrar a través del sistema linfático a los ganglios y activar a los linfocitos naïve. La maduración de las DCs a partir de progenitores hematopoyéticos o monocitos es un proceso complejo, en el que tienen lugar procesos de selección positiva y negativa, regulado principalmente por citoquinas (198, 199), mientras que la recirculación esta regulada por citoquinas y quimioquinas expresadas por células endoteliales linfáticas y linfocitos T (200-202). Durante el proceso la célula expresa moléculas MHC II, receptores implicados en la activación de los linfocitos y quimiorreceptores que posibilitan su recirculación a ganglio linfático una vez que han captado el Ag (194, 203). La expresión de Toll-receptors (TLR) por las DCs en tejido esta muy relacionado con la *inmunidad innata* frente a patógenos, diferentes productos bacterianos activan diferentes TLR y dependiendo del receptor señalizado la célula producirá un determinado patrón de quimioquinas que a su vez inducirá el reclutamiento de una población concreta (neutrófilos, células NK o linfocitos activados)(204, 205). Otra subpoblación muy especializada de DCs son las *células dendríticas foliculares* (FDCs) localizadas en los centros germinales de los folículos linfoides o ganglios linfáticos. Estas APCs no procesan el Ag en el contexto de moléculas MHC II sino que captan los complejos Ag-Ac mediante receptores Fc, son capaces de mantener la memoria antigénica durante largo tiempo y regulan el paso del linfocito B activado a célula plasmática y linfocito B memoria (206).

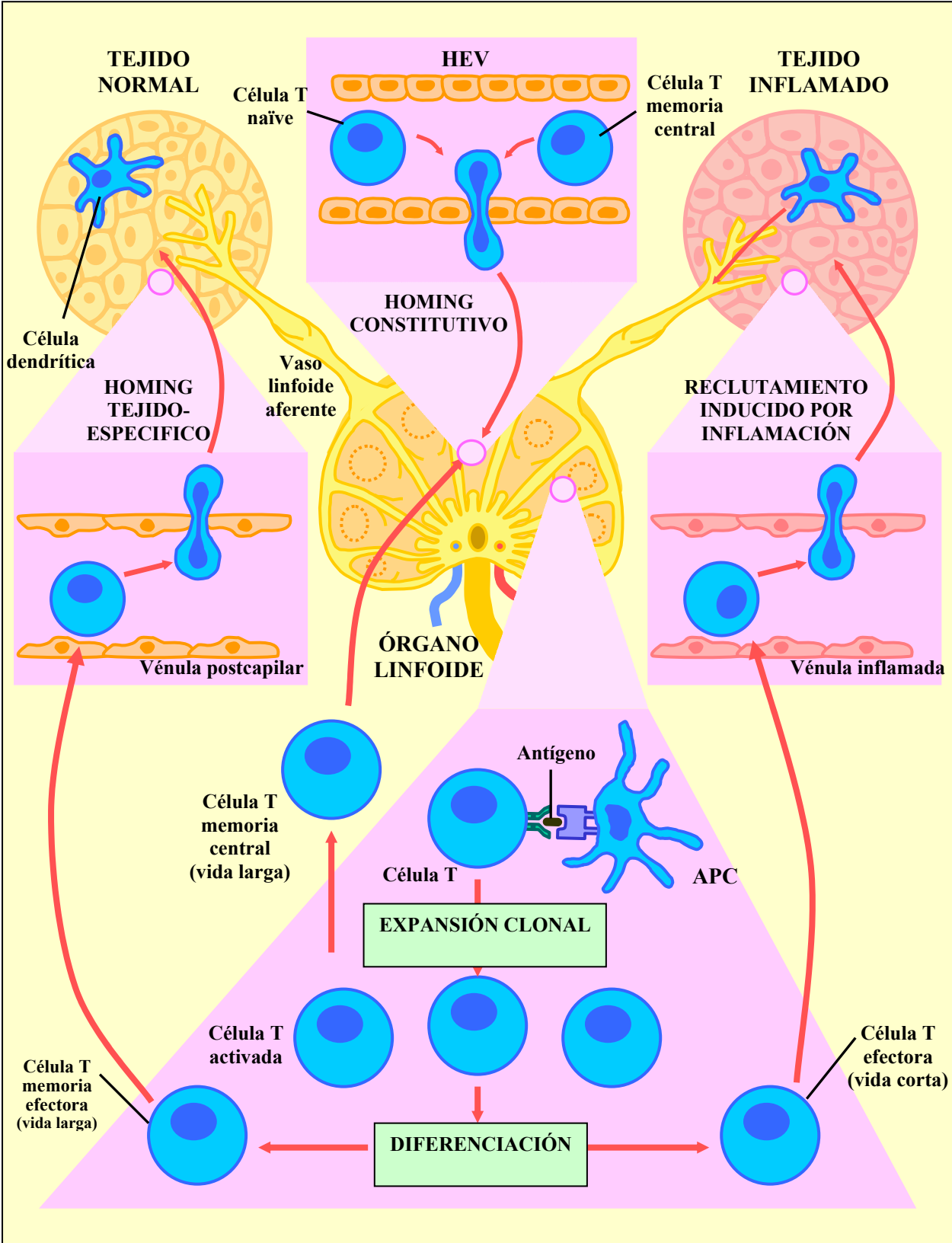
➤ **Células B:** las células B son activadas mediante el reconocimiento del Ag por el BCR y la estimulación de linfocitos T efectores que reconocen Ag presentados en el contexto de MHC II. Las células B presentan Ags de alta afinidad en moléculas MHC II mediante la

internalización de los complejos Ig-Ag, la señalización a través del TCR y moléculas coestimuladoras presentes en el linfocito T inducen la activación de ambas subpoblaciones mediante la producción de diferentes citoquinas (207, 208).

2.3. RECIRCULACIÓN Y ACTIVACIÓN LINFOCITARIA

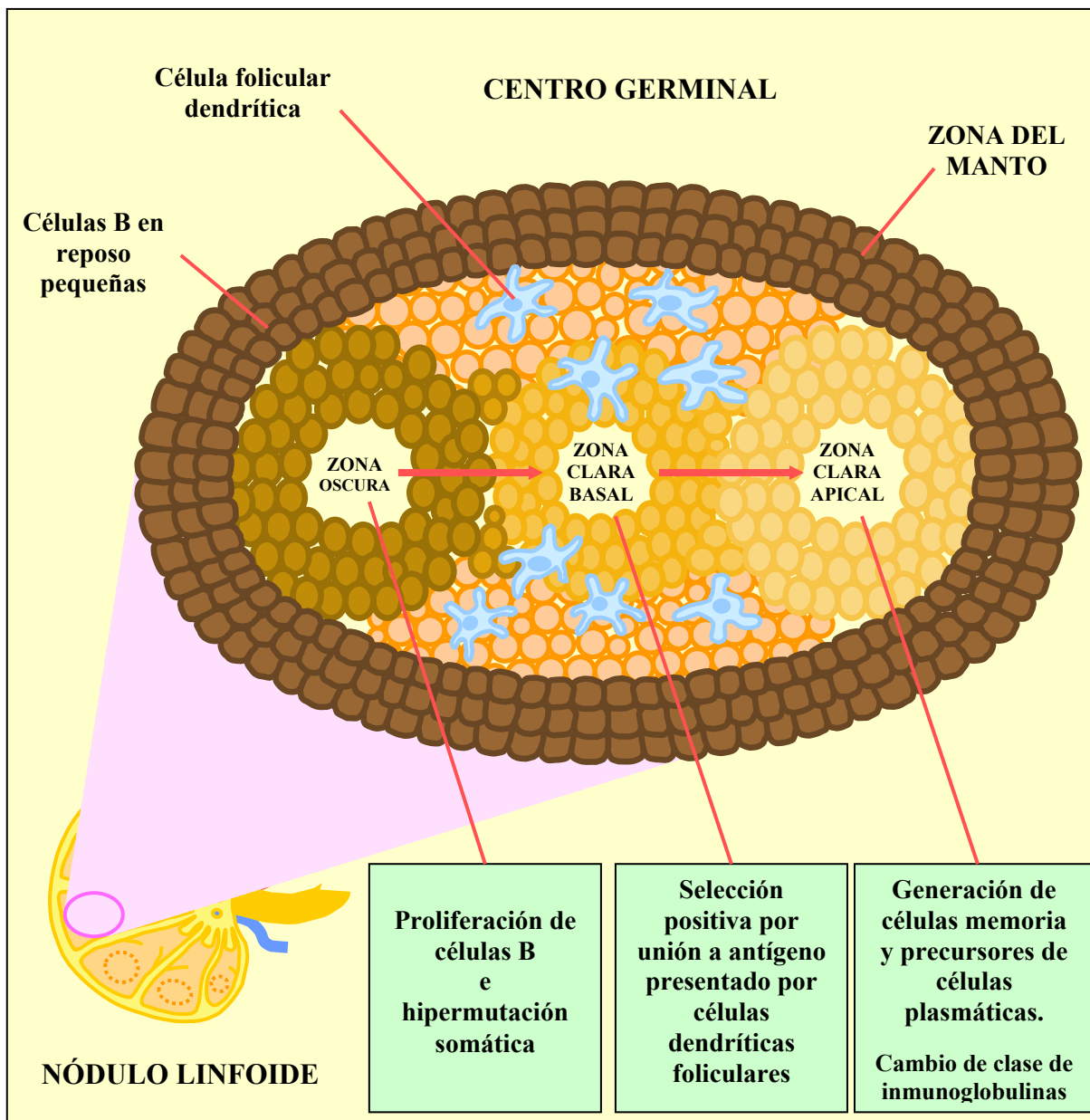
Los **linfocitos T naïve** recirculan continuamente desde la sangre a ganglios linfáticos y otros órganos linfoides secundarios a través de las *vénulas de endotelio alto* (HEV) las cuales expresan moléculas para el reclutamiento constitutivo de linfocitos. La linfa fluye a través de los ganglios procedente de los tejidos periféricos donde las **células dendríticas** captan el material antigénico. En los tejidos inflamados, las células dendríticas que transportan los antígenos son movilizadas hacia los ganglios donde estimulan de manera antígeno-específica a las **células T**. Tras la estimulación las células T proliferan por expansión clonal y se diferencian en *células efectoras* que expresan receptores que hacen posible su migración a los sitios de inflamación. Aunque la mayoría de las células efectoras son de vida corta, unas pocas células con experiencia antigénica sobreviven largo tiempo. Estas células memoria se dividen en dos subpoblaciones en función de su capacidad migratoria, las llamadas *células memoria efectoras* que migran a tejidos periféricos y las *células memoria centrales* que expresan moléculas de homing similares a las células T naïve y migran preferencialmente a órganos linfoides (**Figura 2.3.A**). Las señales de tráfico que dirigen las células memoria y efectoras a tejidos periféricos son órgano-específicas (moléculas requeridas para migración a la piel son diferentes de aquellas para migrar a tubo digestivo), son moduladas por mediadores inflamatorios y son diferentes en los dos subgrupos de células T (Th1 y Th2) que responden a diferentes quimioquinas (209).

Figura 2.3.A. Ruta migratoria de células T



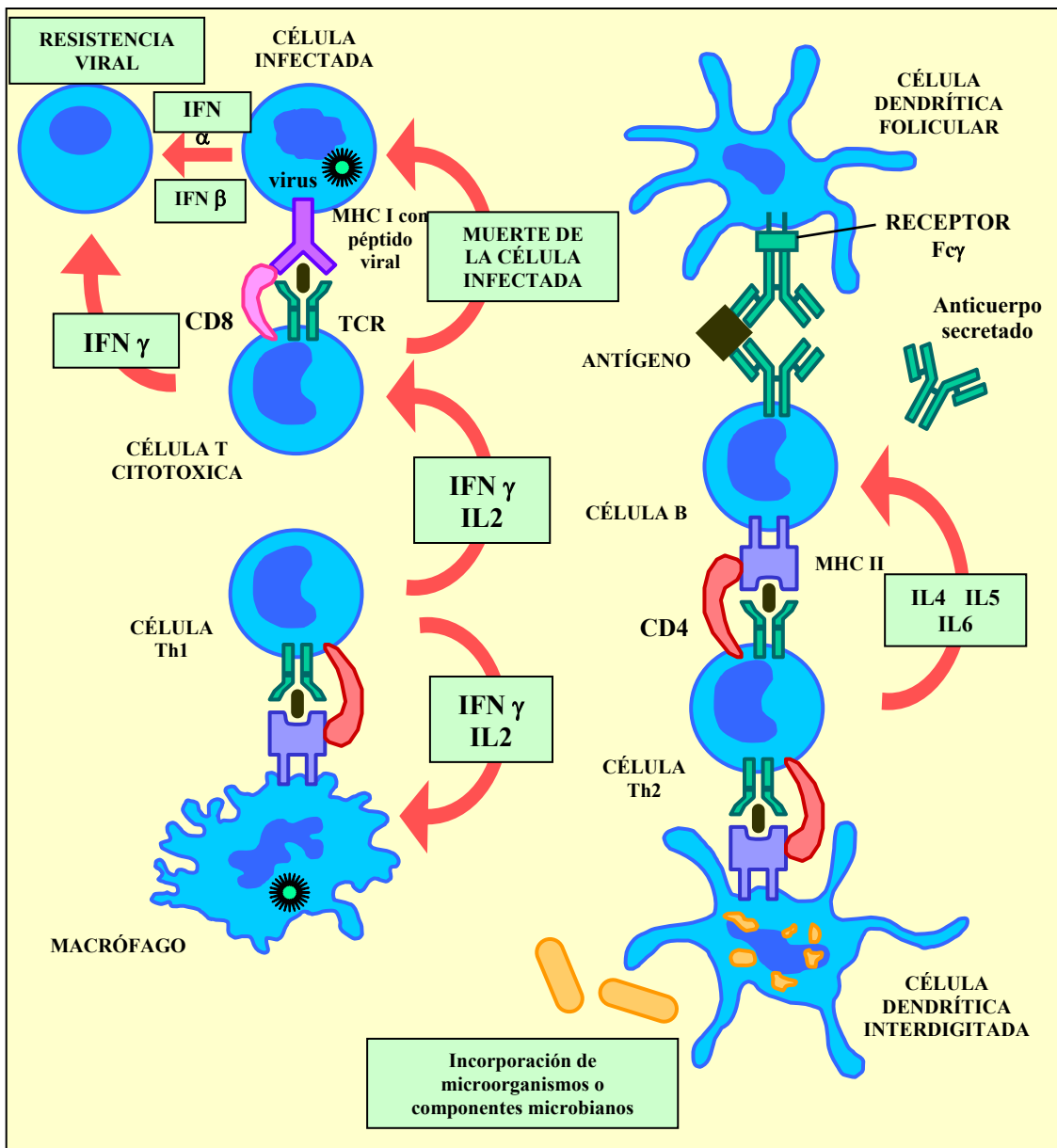
Durante la iniciación de la respuesta inmune adquirida, la proliferación, selección y activación de **células B** tiene lugar en los *centros germinales* (CG), acúmulos de células que se forman en los órganos linfoides secundarios para promover el microambiente adecuado donde las APCs antígeno específicas puedan interactuar con los linfocitos (**Figura 2.3.B**). Las citoquinas (IL2, IL4, IL6, IL10, TGF β) y las moléculas coestimuladoras (CD40, CD19, CD21 y B7) juegan un papel crucial en estas interacciones.

Figura 2.3.B: Centro germinal. Activación de células B



En la *zona oscura* del CG las células B estimuladas por el antígeno proliferan mientras tiene lugar la hipermutación somática de los genes de la región variable de las Igs responsables de la especificidad. En la *zona basal* del CG las células B con alta afinidad para el antígeno son seleccionadas positivamente como resultado de su interacción con complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de **células foliculares dendríticas**, las células no seleccionadas sufren apoptosis o son fagocitadas por macrófagos. Las células seleccionadas migran a la *zona apical* del CG donde continúan proliferando y cambian el isotipo de las Igs para transformarse en **células plasmáticas** secretoras de anticuerpos o **células memoria** (210) (Figura 2.3.B).

Figura 2.3.C: La respuesta linfocitaria



Los linfocitos T naïve se transforman en *linfocitos T efectores/memoria*, tras la activación por el antígeno, y sufren una *polarización* hacia **Th1** (T-helper 1) o **Th2** (T-helper 2) caracterizada por un patrón de expresión de citoquinas específico. En la respuesta inmune mediada por células T producida por enfermedades infecciosas o autoinmunes los linfocitos T son fundamentalmente Th1 (respuesta tipo Th1) y producen IFN γ e IL2 mientras que en la respuesta inmune humoral característica de enfermedades alérgicas, los linfocitos T son Th2 y producen IL4 e IL5 (respuesta Th2) (**Figura 2.3.C**). Sin embargo, actualmente se discute la veracidad de este paradigma, las **APCs** y ciertas subpoblaciones de *linfocitos T efectores no colaboradores*, linfocitos T reguladores **Th3** (secretan IL10 y TGF β) y linfocitos T CD4+CD25+ supresores, influyen en la polarización de los linfocitos T naïve en función del microambiente y el patógeno o antígeno que desencadena la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas. Aunque los modelos animales y estudios *in vitro* sostienen la hipótesis de la dominancia de un tipo de respuesta sobre otro dependiendo de la patología (esclerosis múltiple y artritis reumatoide asociadas a Th1, alergia y asma asociadas a Th2), los estudios clínicos realizados en pacientes revelan resultados contradictorios (210, 211).

2.3.1. Moléculas de adhesión. Selectinas e integrinas

La extravasación de los leucocitos desde la sangre a los órganos linfoides y tejidos sigue cuatro pasos: contacto, rodamiento, activación y captura. En cada uno de estos pasos los leucocitos y las células del endotelio expresan moléculas específicas que regulan estrechamente el proceso ya sea mediante el reconocimiento célula a célula (selectinas e integrinas) o mediante factores solubles (quimioquinas). Las selectinas median el *contacto* con la pared del vaso, las más efectivas son la L-selectina y la P-selectina, pero su unión es de baja afinidad y el leucocito comienza un proceso de *rodamiento* por la pared del vaso ralentizado por la E-selectina y la α 4-integrina. Durante el rodamiento los quimioattractantes secretados o presentados por las células endoteliales activan los leucocitos a través de receptores específicos (quimiorreceptores), lo que induce la activación de integrinas (β 2 integrinas, α 4 integrinas) facilitando la unión de alta afinidad necesaria para la *captura* y posterior *extravasación* (209, 212) (**Figura 2.3.1.** y **Tabla 2.3.1.**). El patrón de selectinas, integrinas y quimiorreceptores actúa como código direccional que guía la extravasación y migración preferencial de células linfoides a microambientes específicos dentro de los diferentes tejidos tanto en condiciones fisiológicas normales como durante procesos inflamatorios (213).

Figura 2.3.1: Fases y componentes moleculares esenciales en la cascada de adhesión.
 QR (quimiorreceptor), Recep. (receptor), Lig. (ligando), min. (minutos), seg. (segundos)

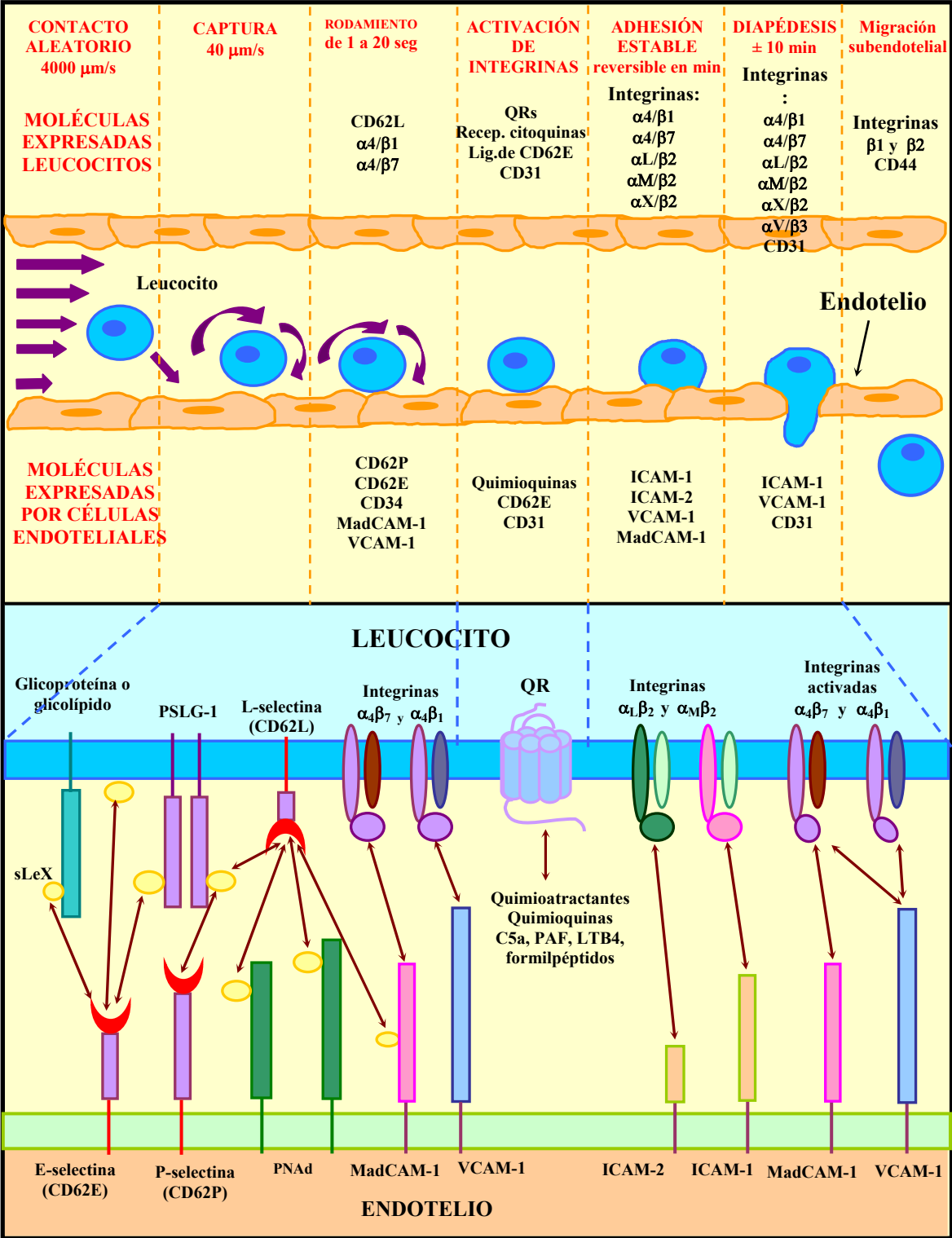


Tabla 2.3.1: Selectinas, integrinas y sus ligandos

MOLÉCULA DE ADHESIÓN (nombre alternativo)	DISTRIBUCIÓN	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN
Selectinas		
Todas las selectinas están activadas constitutivamente		
L-selectina (CD62L)	Todos los leucocitos excepto células efectoras/memoria	Se pierde rápidamente tras la activación
E-selectina (CD62E)	células endoteliales	Expresión inducida por TNF α , IL1 y endotoxina
P-selectina (CD62P)	células endoteliales, plaquetas	Se almacena intracelularmente en células en reposo y se transloca rápidamente a la membrana tras la activación por histamina, trombina o superóxido
Ligandos de selectinas		
Los ligandos más relevantes son O-glicanos sializados α1,3 fucosilados		
Sialil-Lewis ^x (_s CD15)	células mieloides, algunas células memoria (Th1)	Su expresión en leucocitos depende de la fucosiltransferasa VII
Glicoproteína ligando 1 de P-selectina (PSLG-1)	Todos los leucocitos	La glicosilación y/o sulfatación de la tirosina es esencial para la unión a selectina
Adresina de nódulo periférico (PNAd)	células altas endoteliales en nódulos linfoides y sitios de inflamación crónica	Sialil-Lewis ^x -like azúcar sulfatado presentado por 4 mucinas endoteliales: CD34, podocalixina, GlyCAM-1 y sgp200
Antígeno linfocitario cutáneo	células T que recirculan a piel, células dendríticas, granulocitos, linfomas con tropismo hacia piel	Única glicofoma de la PSLG-1 expresada por en células T memoria que recirculan a piel
β2 integrinas		
La unión de alta afinidad es dependiente de activación		
α _L β 2 (LFA-1, CD11aCD18)	Todos los leucocitos	Aumento de la expresión en células memoria y efectoras
α _M β 2 (Mac-1, CD11bCD18)	células mieloides, algunas células T activadas	Rápida regulación positiva de la expresión en células mieloides activadas
α _X β 2 (p150,95, CD11cCD18)	células dendríticas	Expresión constitutiva
α _D β 2 (CD11dCD18)	monocitos, macrófagos, eosinófilos	Altos niveles de expresión células “foam” en placas
α2 integrinas		
Su función esta regulada por señales de activación		
α 4 β 1 (VLA-4)	La mayoría de los leucocitos, excepto neutrófilos	Aumento de la expresión en células efectoras y memoria
α 4 β 7	Linfocitos, células NK, mastocitos, basófilos, monocitos	Aumento de la expresión en células memoria y efectoras que recirculan a tubo digestivo
Superfamilia de las inmunoglobulinas		
ICAM-1 (CD54)	La mayoría de los tipos celulares	Regulación positiva de la expresión por LPS y citoquinas inflamatorias
ICAM-2 (CD102)	células endoteliales, plaquetas	Expresión constitutiva sin cambios durante la inflamación
VCAM-1 (CD106)	células endoteliales, estroma de médula ósea, células foliculares dendríticas, osteoblastos, mesotelio	Ausencia en la mayoría de células endoteliales en reposo, expresión inducida por citoquinas
Adresina de mucosa-molécula de adhesión 1 (MadCAM-1)	vénulas altas endoteliales en GALT y sitios de inflamación crónica, lámina propia, bazo	Expresión constitutiva en vénulas altas endoteliales, e inducida en casos de insulinitis, hiperplasia tímica y algunas formas de artritis

Tabla 2.3.1: Selectinas, integrinas y sus ligandos (continuación)

MOLÉCULA DE ADHESIÓN (nombre alternativo)	LIGANDOS Y CONTRARRECEPTORES	FUNCIÓN EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS T
Selectinas	Todas las selectinas unen sialil-Lewis^X-like azúcares	
L-selectina (CD62L)	PNAd, PSLG-1, MadCAM-1, E-selectina y otras	Recirculación a nódulos linfoides y placas de Peyer
E-selectina (CD62E)	PSLG-1, ESL-1, anígeno linfocitario cutáneo, sialil-Lewis ^X , glicoproteínas y glicolípidos	Recirculación de células memoria y efectoras a piel y sitios de inflamación
P-selectina (CD62P)	PSLG-1, CD24, PNAd	Recirculación de células memoria o efectoras (Th1) a sitios de inflamación, interacción mediada por plaquetas con vénulas que expresan PNAd
Ligandos de selectinas		
Sialil-Lewis ^X (sCD15)	Todas las selectinas	Su función depende de la presentación de la molécula
Glicoproteína ligando 1 de P-selectina (PSLG-1)	Ligando esencial para P-selectina, también une L- y E-selectina	Recirculación de células memoria y efectoras (Th1) a tejido inflamado, unión a plaquetas activadas
Adresina de nódulo periférico (PNAd)	L-selectina y E-selectina en plaquetas activadas	Recirculación de células T naïve y células memoria centrales a nódulos linfoides
Antígeno linfocitario cutáneo	E-selectina	Recirculación de células memoria y efectoras a piel inflamada
β₂ integrinas		
α _L β ₂ (LFA-1, CD11aCD18)	ICAM-1, 2, 3, 4 y 5	Recirculación de todos los linfocitos a nódulos linfoides, placas de Peyer y la mayoría de los sitios de inflamación, adhesión a APCs
α _M β ₂ (Mac-1, CD11bCD18)	ICAM-1, factor X, fibrinógeno, C3b _i	Desconocida
α _X β ₂ (p150,95, CD11cCD18)	Fibrinógeno, C3b _i	Desconocida
α _D β ₂ (CD11dCD18)	VCAM-1, ICAM-1 y 3	Desconocida
α₂ integrinas		
α ₄ β ₁ (VLA-4)	VCAM-1, fibronectina, α ₄ integrina	Recirculación de células memoria y efectoras a tejidos inflamados, especialmente pulmón
α ₄ β ₇		Recirculación de todos los linfocitos GALT
Superfamilia de las inmunoglobulinas		
ICAM-1 (CD54)	α _L β ₂ , α _M β ₂ , fibrinógeno	Ligando endotelial clave para β ₂ integrinas
ICAM-2 (CD102)	α _L β ₂	Desconocida
VCAM-1 (CD106)	α ₄ β ₁ , α ₄ β ₇ y α _D β ₂	Recirculación de células memoria y efectoras a tejido inflamado
Adresina de mucosa-molécula de adhesión 1 (MadCAM-1)	α ₄ β ₇ , L-selectina	Recirculación de todos los linfocitos a GALT

TNFα: factor de necrosis tumoral α; **ESL-1:** ligando 1 de E-selectina; **Th1:** células T colaboradoras tipo 1; **GlyCAM-1:** molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1; **spg200:** glicoproteína sializada de 200Kd; **Mac-1:** antígeno de macrófagos 1; **p150,95:** proteína con subunidades de 150Kd y 95Kd; **ICAM:** molécula de adhesión intracelular; **VCAM-1:** molécula de adhesión celular vascular 1; **VLA-4:** antígeno muy tardío 4

La familia de las integrinas esta formada por 3 miembros, heterodímeros alfa-beta, que comparten una subunidad beta común, β_2 (CD18), implicados en una variedad de funciones de adhesión célula-célula y célula-matriz. Estas interacciones son cruciales para la regulación de la hematopoesis y la maduración de los timocitos, la dirección y el control del tráfico leucocitario y la migración a través de tejidos y el desarrollo de las respuestas inflamatorias inmunes y no inmunes. La adhesión estacionaria y la migración dependen fundamentalmente de dos integrinas pertenecientes a la familia de las β_2 (CD18) integrinas, el CD11a/CD18 y el CD11b/CD18 (214, 215).

CD11a/CD18 (LFA-1): pertenece a la familia de las β_2 integrinas y se expresa en los progenitores tempranos de todos los linajes mieloides, de ahí la nomenclatura original de antígeno leucocitario común (LFA) (216). Sus ligandos son el ICAM-1 (CD54) que reconoce la subunidad beta 2 y se expresa en células epiteliales y monocitos, y el CD102 (ICAM-2) y el CD50 (ICAM 3) expresados por células endoteliales y leucocitos (217, 218). Además de estabilizar el rodamiento de los leucocitos a través del endotelio, el complejo LFA-1 participa en las interacciones entre las células T y las APCs principalmente en la unión entre el correceptor CD4 y el MHC II y en la unión de las células citotóxicas y sus células diana (215, 219, 220). La intensidad de expresión de esta molécula en linfocitos T se asocia a diferentes patrones de recirculación linfocitos T. Los linfocitos T naïve expresan niveles bajos de CD11a (CD11a^{low}) y recirculan a ganglio linfático, donde entran en contacto con el antígeno y adquieren capacidad efectora y proliferativa transformándose en células efectoras/memoria. Estas células efectoras y efectoras memoria expresan altos niveles de CD11a (CD11a^{high}) y recirculan a los lugares de inflamación (221-223).

CD11b/CD18: pertenece a la familia de las β_2 integrinas y se expresa en monocitos, macrófagos, granulocitos, células NK y células Langerhans (216, 224). Su principal ligando es el CD54 (ICAM1) expresado por las células epiteliales, pero también se une a fibrinógeno en la matriz extracelular y al factor C3bi del complemento (225, 226). Al igual que el CD11a se encuentra implicado en la adhesión a células endoteliales que posibilita la extravasación a los focos de inflamación y sus niveles de expresión aumentan considerablemente en macrófagos, granulocitos y linfocitos activados (216).

La familia de las selectinas engloba tres moléculas de adhesión expresadas en la superficie de células endoteliales (E-selectina y P-selectina), leucocitos (L-selectina) y plaquetas (P-selectina), cuya función principal es la recirculación de leucocitos a nódulos linfoides y focos de inflamación. Están implicadas en las fases de contacto aleatorio, captura y rodamiento del proceso de extravasación leucocitaria. La *E-selectina* (CD62E) juega un papel crucial en las primeras fases de la respuesta inmune inflamatoria, su principal ligando es el PSGL-1 expresado por leucocitos pero también reconoce ciertas glicoproteínas expresadas por linfocitos. Entre otras funciones, la E-selectina recluta preferencialmente células T memoria hacia la piel, independientemente de su grado de activación, lo que proporciona un mecanismo de captura de células T en reposo de la circulación (218, 227). La *P-selectina* participa activamente en la fase de rodamiento y promueve la localización inicial de leucocitos y plaquetas a los focos de inflamación. Su ligando principal es el PSLG-1 expresado por neutrófilos, monocitos y linfocitos, y entre las funciones más importante se encuentra su participación en las interacciones entre plaquetas activadas y neutrófilos (218, 227).

CD62L: la *L-selectina* fue originariamente definida como el “homing receptor” de linfocitos (receptor de recirculación a órganos linfoides), y actúa regulando su unión a vénulas de endotelio alto en nódulos linfoides en órganos linfoides primarios y tejido linfoide. Como en el caso de las otras dos selectinas, reconoce PSLG-1 sobre células endoteliales, pero además une otros ligandos más específicos de tejido como PNA_d (adhesina de nódulo periférico) y MadCAM-1 (adhesina de mucosa) (218). Otro ligando importante, asociado a otras moléculas de adhesión (PSLG-1, PNA_d, glicoproteínas, glicolípidos) o expresado directamente por células endoteliales, es el sialil-6-sulfo-Lewis^X, que regula específicamente la recirculación de linfocitos T naïve (CD45RA+CCR7+) a nódulo linfoide, y de linfocitos T memoria colaboradores a intestino (CD45RO+CCR9+) y piel (CD45RO+CCR4+) (227). La L-selectina se expresa en la mayoría de los leucocitos, con excepción de un porcentaje de linfocitos T memoria y células NK, esto incluye aproximadamente el 50% de linfocitos circulantes, y muy específicamente linfocitos B y linfocitos T naïve, el 40-80% de monocitos y el 95% de granulocitos. Esta molécula de adhesión no solo está implicada en la recirculación de linfocitos a órganos linfoides sino que juega un importante papel en la dirección de leucocitos a los focos de inflamación e infección. Es una molécula clave en los procesos de inflamación aguda y crónica, estudios recientes en pacientes con alto riesgo de desarrollar síndrome de distress respiratorio agudo (ARDS), sujetos que han sufrido trauma o pancreatitis aguda, han

demostrado un incremento de la expresión de CD62L por neutrófilos, monocitos y linfocitos en fases muy tempranas tras el daño (228).

2.3.2. Quimioquinas y quimiorreceptores

Las *quimioquinas* constituyen una amplia familia de moléculas con capacidad quimiotáctica implicadas en el tráfico linfocitario y el reclutamiento de linfocitos a los focos inflamatorios e infecciosos. Estas moléculas quimiotácticas se agrupan en 4 familias caracterizadas por la presencia en el amino terminal de 4 cisteínas en posiciones muy conservadas: las CXC o α -quimiocinas (CXCL1-16), con un aminoácido separando las dos primeras cisteínas, las CC o β -quimiocinas (CCL1-28), con las dos cisteínas adyacentes, las C o γ -quimiocinas (XCL1,2), con solo el segundo y cuarto residuo conservado y las CX₃C o δ -quimiocinas (CX3CL1), con 3 residuos entre las dos cisteínas (229). Los *quimiorreceptores* pertenecen a la familia de receptores de 7-dominios transmembrana acoplados a proteína G. La interacción de la quimioquina con su receptor provoca la disociación de las subunidades alfa y beta-gamma de la proteína G que activa varias vías de señalización intracelular que incluyen AMPc, flujo de calcio y protein-kinasas. Actualmente hay identificados 19 quimiorreceptores: 6 α -quimiorreceptores (CXCR1-6), 11 β -quimiorreceptores (CCR1-11), un γ -quimiorreceptor (XCR1) y un δ -quimiorreceptor (CX₃CR1). Existe un reconocimiento cruzado entre las quimioquinas y sus receptores, una quimioquina reconoce más de un receptor y viceversa, con excepción de la β -quimioquina, MIP3 α que solo es reconocida por el quimiorreceptor CCR6, y los miembros de la δ y γ -quimiocinas. Sin embargo, existe una restricción receptor-ligando, las CC-quimioquinas se unen a CC-quimiorreceptores y las CXC-quimioquinas a CXC-quimiorreceptores, probablemente relacionada con diferencias estructurales entre los miembros de cada familia (230, 231).

La migración de una célula a su lugar de destino requiere la expresión secuencial de varios quimiorreceptores en respuesta a diferentes gradientes de quimioquinas en un proceso conocido como “multistep navigation”. El switch de un quimiorreceptor a otro viene determinado por la desensibilización inducida por el ligando del quimiorreceptor precedente (232). Aunque las quimioquinas y los quimiorreceptores se asociaron en un primer momento con la respuesta inflamatoria, en la actualidad se sabe que están implicadas en numerosos procesos que incluyen el tráfico linfocitario, la homeostasis celular, el desarrollo y maduración de los leucocitos, la respuesta inmune innata y mediada por células T, la angiogénesis y la metástasis celular (233, 234, 235).

Tabla 2.3.2.A: Quimioquinas

Nombre	Sinónimos	Actividad quimiotáctica
α-quimioquinas		
CCL1	I-309, TCA3 (ratón)	Monocitos, células T
CCL2	MCP-1, MCAF, JE (ratón)	Monocitos, células T, basófilos, células NK, progenitores
CCL3	MIP-1 α , MIP-1 α S, MIP-1 α P, LD78 α , LD78 β , LD78 γ	Monocitos, células T, células NK, basófilos, eosinófilos, CD, progenitores hematopoyéticos
CCL4	MIP-1 β	Monocitos, células T, CD, células NK, progenitores
CCL5	RANTES	Células T, eosinófilos, basófilos, células NK, CD
CCL6	C10 (ratón), MRP-1 (ratón)	Macrófagos
CCL7	MCP-3	Monocitos, células T, eosinófilos, basófilos, células NK, CD
CCL8	MCP-2	Monocitos, células T, eosinófilos, basófilos, células NK
CCL9	MRP-2 (ratón), MIP-1 γ (ratón)	Células T
CCL10	CCF18	Células T
CCL11	Eotaxina	Eosinófilos, células T
CCL12	MCP-5 (ratón)	Monocitos, células T, eosinófilos
CCL13	MCP-4, CK β 10	Monocitos, células T, eosinófilos
CCL14	CC-1, HCC-1, NCC-2, CCCK-1/-3, CK β 1, MCF1	Monocitos, progenitores hematopoyéticos
CCL15	HHCC-2, Lkn-1, MIP-5, CC-2, NCC-3, MIP-1 δ	Monocitos, células T, eosinófilos
CCL16	NCC-4, LEC, HCC-4, LMC, Mtn-1, LCC-1, CK β 12	Células T, neutrófilos
CCL17	TARC	Células T
CCL18	DC-CK1, PARC, MIP-4, AMAC-1, CK β 7	Células T naïve
CCL19	Exodus-3, ELC, MIP-3 β , CK β 11	Células T, células B, CD, células NK activadas
CCL20	Exodus-1, MIP-3 α , LARC, ST38 (ratón)	Células T, células B,
CCL21	Exodus-2, SLC, 6-Ckine, TCA4, CK β 9	Células T, células B, CD, células NK activadas, macrófagos
CCL22	MDC, ABCD-1 (ratón), DC/B-CK (ratón)	Células T, eosinófilos
CCL23	MIP-3, MPIF-1, CK β 8-1	Células dendríticas, osteoclastos
CCL24	MPIF-2, CK β 6, eotaxina-2	Células TH2 efectoras
CCL25	TECK, CK β 15	Células T memoria, células B, timocitos inmaduros
CCL26	Eotaxina-3, MIP-4 α	Eosinófilos, células T
CCL27	ALP, Skinkine, ILC, Eskine, CTAK	Células T CLA+
CCL28	-	Células T
β-quimioquinas		
CXCL1	GRO α , MGSA, N51/KC (ratón), MIP-2	Neutrófilos
CXCL2	GRO β , MIP-2 α	Neutrófilos
CXCL3	GRO γ , MIP-2 β	Neutrófilos
CXCL4	Factor de plaquetas-4	Fibroblastos, células endoteliales
CXCL5	ENA-78	Neutrófilos
CXCL6	GPC-2	Neutrófilos
CXCL7	PBP, CTAPIII, β -TG, NAP-2	Fibroblastos
CXCL8	IL-8	Neutrófilos, células T, basófilos
CXCL9	Mig	Células T, progenitores
CXCL10	GIP-10, crg-2 (ratón)	Células T
CXCL11	H174, β -R1, I-TAC, IP-9	Células T
CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β , PBSF	Monocitos, células B, progenitores hematopoyéticos
CXCL13	BLC, BCA-1	Células B
CXCL14	BRAK, bolequina	Neutrófilos, células NK, células B
CXCL15	Pulmoquina, weche	Neutrófilos del espacio interpulmonar
CXCL16	-	Células dendríticas
γ-quimioquinas		
XCL1	Linfotactina α , SCM-1 α , ATAC	Células B, células T, células NK, neutrófilos
XCL2	Linfotactina β , SCM-1 β , ATAC	
δ-quimioquinas		
CX ₃ CL1	Fractalquina, neurotactina (ratón)	Células T efectoras

CD: célula dendrítica

Tabla 2.3.2.B: Quimiorreceptores

Nombre	Sinónimos	Ligando de mayor afinidad	Función biológica
α-quimiorreceptores			
CCR1	CKR1	CCL14 (HCC-1)	Respuesta antiviral.
CCR2	CKR2	CCL2 (MCP-1)	Reclutamiento de macrófagos.
CCR3	CKR3	CCL11 (eotaxina) CCL24 (eotaxina-2)	Respuesta a parásitos y reclutamiento de células Th2.
CCR4	CKR4	CCL17 (TARC) CCL22 (MDC, ABCD-1, DC/B-CK)	Homing a la piel y reclutamiento de Th2.
CCR5	CKR5	CCL4 (MIP-1β)	Reclutamiento de macrófagos y células Th2.
CCR6	STRL22	CCL20 (exodus-1, MIP-3α, LARC, ST38)	Homing de células dendríticas
CCR7	EB11	CCL19 (exodus-3, ELC, MIP-3β, CKβ11) CCL21 (exodus-2, SLC, 6-Ckine, TCA4, CKβ9)	Homing de células T, B y CD hacia órganos linfoides secundarios, reclutamiento de células NK.
CCR8	TER1	CCL1 (I-309, TCA-3)	Reclutamiento de células Th2.
CCR9	GPR9-6	CCL25 (TECK, CKβ15)	Homing hacia intestino, migración de timocitos.
CCR10	GPR2	CCL27 (ALP, Skinkine, ILC, Eskine, CTAK) CCL28	Homing a la piel de células T.
CCR11	PPR1	CCL2 (MCP-1) CCL19 (exodus-3, ELC, MIP-3β, CKβ11)	Reclutamiento de macrófagos.
DARC		Varios CC	Receptor de la malaria, no señala sink-quimioquina.
β-quimiorreceptores			
CXCR1	IL-8RA		Quimiotaxis y desregulación de neutrófilos.
CXCR2	IL-8RB	CXCL1 (GROα, MGSA, N51/KC (ratón), MIP-2) CXCL7 (PBP, CTAPIII, β-TG, NAP-2) CXCL5 (ENA-78)	Quimiotaxis y desregulación de neutrófilos.
CXCR3	GPR9	CXCL10 (IP-10, crg-2 (ratón)) CXCL11 (H174, β-R1, I-TAC, IP-9)	Respuesta de células T.
CXCR4	LESTR	CXCL12 (SDF1α, SDF-1β, PBSF)	Respuesta de células B, homing de células madre.
CXCR5	BLR1	CXCL13 (BLC, BCA-1)	Respuesta de células B.
CXCR6	Bonzo	CXCL6	Células T activadas.
γ-quimiorreceptores			
XCR1	GPR5	XCL1 & 2 (linfocactina)	Inflamación
δ-quimiorreceptor			
CX ₃ CL1	V28	CX ₃ CL1 (fractalquina, neurotactina (ratón))	Inflamación

CD: célula dendrítica

Durante la respuesta inmune tanto las células presentadoras de antígenos (monocitos, células dendríticas y células B) como los linfocitos T expresan un patrón secuencial de quimiorreceptores que guían su extravasación a órganos linfoides, controlando su maduración y posterior activación (236-239). Los estudios realizados en diversas enfermedades han revelado la participación de una amplia variedad de quimioquinas y quimiorreceptores en el reclutamiento, recirculación y activación de diferentes tipos celulares implicados en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad (237-240).

➤ **CCR2:** receptor de 7 dominios transmembrana asociados a proteína G. Las vías principales de señalización incluyen AMPc, flujo de calcio y protein-quinasas. El primer loop extracelular, en el extremo aminoterminal, posee dos microdominios, el primero es responsable de la unión de alta afinidad al ligando, mientras que el segundo es necesario para la activación del receptor y la iniciación de la señalización (241, 242). Los receptores se redistribuyen en el polo celular que migra a favor del ligando formando homodímeros (243, 244). Existen dos isoformas, CCR2A y CCR2B, generadas por “splicing” alternativo del extremo carboxilo, la isoforma que se expresa mayoritariamente en superficie y contribuye a la señalización por el ligando es la CCR2B (245), mientras que la CCR2A se encuentra predominantemente en el compartimento celular y su función fisiológica no está muy clara. Es posible que, en casos de reducción grave de la expresión de la isoforma CCR2B, la isoforma CCR2A cobre mayor importancia funcional (246).

El ligando principal y de mayor afinidad es el MCP-1, y su unión provoca desensibilización del quimiorreceptor mediante kinasas y/o (247) internalización en compartimentos celulares que permiten una rápida respuesta de regeneración en superficie. Así mismo, induce la formación del urópodo y la redistribución de moléculas de adhesión en linfoblastos que permiten su interacción con el endotelio (248). Otros ligandos en orden decreciente de afinidad son MCP-2>MCP-3>MCP-4 (249, 250).

Se expresa en monocitos, linfocitos B, linfocitos T y células NK. La mayoría de los *monocitos* expresan CCR2 de forma constitutiva, con excepción de una pequeña subpoblación CD14⁺CD16^{high} que produce bajos niveles del transcrito, pero su expresión disminuye drásticamente durante la diferenciación a macrófagos inducida por diferentes estímulos (LPS, IL1 β , TNF α e IFN γ) (251-254). En *linfocitos B*, la expresión del quimiorreceptor es constitutiva con un porcentaje en torno al 80% en condiciones basales (255). En linfocitos T su expresión

esta restringida a linfocitos T memoria o es inducida en linfocitos T CD45RO+ tras activación con IL2 (256). Sin embargo, la estimulación a través del TCR de *linfocitos memoria/efectores* provoca un cambio transitorio en la respuesta al ligando mediante desensibilización o internalización del receptor, lo que permite la recirculación de células T activadas en tejido hacia nódulos linfoides o tejidos linfoides ectópicos (256-258). De forma similar, las *células NK* no expresan el receptor en condiciones basales, pero la estimulación tanto por el ligando, MCP-1, como por la citoquina IL2, incrementa significativamente su expresión con un patrón diferente tanto del receptor como del ligando entre las células NK que se adhieren al plástico y las que no (259, 260). Durante la formación de conjugados célula-célula, el CCR2 se polariza, formando heterodímeros con el CCR5, en el punto de contacto, al tiempo que induce la redistribución de integrinas al urópodo que favorecen el reclutamiento (261).

Otras poblaciones que expresan CCR2 son las *células dendríticas inmaduras* derivadas de monocitos, las cuales pierden el receptor tras la maduración (262, 263), y las *células endoteliales*, donde contribuye, junto con la expresión de MCP-1, a la formación de vasos sanguíneos (264).

Los estudios realizados en modelos animales y humanos demuestran la implicación del CCR2 y MCP-1 en patologías que cursan con procesos inflamatorios como la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y enfermedades respiratorias (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis crónica) (237, 239, 265, 266).

➤ **CCR5:** receptor de 7 dominios transmembrana asociados a proteína Gi acoplada a fosfolipasas SHP1 y SHP2. Tiene una homología del 71% con CCR2B, pero a diferencia de este quimiorreceptor, el extremo aminoterminal no es suficiente para una respuesta eficiente y se necesita el 2º loop extracelular (267, 268). Las vías principales de señalización incluyen AMPc, generación de inositol trifosfato, flujo de calcio y protein-quinasas en respuesta a sus ligandos, RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (250). RANTES induce la polarización del receptor en el frente de migración, la formación del urópodo y la redistribución de integrinas en linfoblastos T (243, 248).

El CCR5 se expresa fundamentalmente en *linfocitos T activados* y linfocitos polarizados hacia Th1 (269, 257, 270, 271, 272). El incremento de la expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ correlaciona con la adquisición de un fenotipo de célula memoria/activada, previo al inicio de la división celular, y provoca el aumento de la quimiotaxis hacia MIP-1 β (CCL4) (273). La

mayoría de los linfocitos T CD4⁺ infiltrados en tejido expresan CCR5, independientemente del tipo de tejido, lo que descarta una participación en el homing linfocitario específico, pero sugiere una función más amplia en la extravasación a tejidos inflamados en situaciones de inflamación aguda (274). Su expresión en linfocitos T se regula positivamente en presencia de IL2 pero la señalización a través del TCR provoca su internalización transitoria (275, 258). En *células NK*, su distribución, regulación y función son similares a las observadas en CCR2, inducción por IL2, expresión diferencial entre adherentes y no adherentes y participación en conjugados célula-célula mediante la formación de heterodímeros (261, 260). En *monocitos*, su expresión aumenta con el proceso de diferenciación o tras estimulación *in vitro* con IFN γ e IL10, y los niveles son elevados en la subpoblación CD14⁺CD16^{high} (276, 277, 254). Otras poblaciones que expresan este QR son las células precursoras CD34⁺ de cordón y las células dendríticas inmaduras (278, 262, 279).

Numerosos estudios ponen de manifiesto la implicación tanto del CCR5 como de sus principales ligandos, RANTES y MIP1 α , en patologías inflamatorias asociadas a respuesta Th1 como la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple, o la artritis reumatoide (271, 280, 281, 282). Además, es un factor clave en la patofisiología del HIV, ya que actúa como co-receptor, junto con el CXCR4 y el CD4, en la fusión de la envoltura viral y posterior penetración del virus en linfocitos T CD4⁺ (283-285).

➤ **CCR6:** receptor de 7 dominios transmembrana capaz de generar flujo de Ca²⁺ intracelular en respuesta a su único ligando, MIP-3 α , una quimioquina clave en la adhesión celular y recirculación de diferentes poblaciones linfocitarias que expresan CCR6 (286).

El CCR6 es un quimiorreceptor implicado en procesos de maduración y recirculación a órganos linfoides primarios y secundarios de diferentes poblaciones leucocitarias. Se expresa en linfocitos T CD45RO⁺, principalmente en linfocitos CD4⁺CD45RO⁺, y controla la recirculación a mucosa intestinal (287, 288). El incremento de la expresión de CCR6 en linfocitos T CD4⁺ correlaciona con la adquisición de un fenotipo de célula memoria /activada, previo al inicio de la división celular, sin embargo, existe un control postranscripcional de la expresión en membrana mediante la regulación de la translocación de la proteína desde los reservorios intracelulares, y el aumento del QR no supone una mayor respuesta quimiotáctica hacia MIP-3 α (CCL20) (273). Al igual que en el caso del CCR2 y CCR5, la señalización a través del TCR de la subpoblación de *linfocitos T memoria/efectores* provoca la desensibilización e

internalización del quimiorreceptor (258). En las *células B* el CCR6 se encuentra implicado en su desarrollo, maduración y recirculación, las células madre CD34(+)lin(-), células pro-B (CD34+CD19+), y células pre-B/inmaduras (CD19+CD10+) no expresan CCR6 y cuando pierden el CD10 y pasan a células B maduras comienzan a expresarlo (células B naïve y memoria de sangre periférica, cordón umbilical y médula ósea). El CCR6 se internaliza cuando la célula es señalizada en centros germinales para readquirirse de nuevo en un estadio post-centro germinal en células B maduras capaces de responder al antígeno (288, 289). Las células B naïve, en ausencia de estímulo, expresan CCR6 pero no tienen capacidad quimiotáctica hacia MIP-3 α la respuesta al ligando se adquiere tras la emigración a la periferia y durante la maduración en el pool de células B recirculantes (287, 290). La expresión del QR en *células NK* se restringe a la fracción adherente tras estimulación con IL2 (260).

Las *células dendríticas* también regulan la expresión de CCR6 durante su maduración, lo que les permite recircular a los órganos linfoides primarios y secundarios para realizar su función como APCs especializadas. Las células dendríticas inmaduras derivadas de precursores CD34+ de médula ósea expresan CCR6 y migran en respuesta a MIP3 α producido en áreas ricas en células T o focos de lesión. Una vez allí entran en contacto con el antígeno y maduran en respuesta a TNF α o LPS, este proceso produce un intercambio de quimiorreceptores en membrana, internalizan CCR6 y expresan CCR7, que provoca la migración de las células maduras cargadas de antígeno a zonas ricas en células T y órganos linfoides productores de MIP-3 β y 6C-kine (291-293). Uno de los principales puntos de recirculación de células dendríticas, especialmente de las células Langerhans, es la mucosa intestinal, el tandem MIP-3 α /CCR6 recluta células dendríticas CD11b+ a la superficie de la mucosa (dominio subepitelial) (292, 294).

El CCR6 y MIP-3 α participan activamente en la inmunidad de piel y mucosas mediante la recirculación específica de DCs y linfocitos T memoria/efectores a los focos de inflamación, así pues, se encuentran implicados en el desarrollo y progresión de procesos patológicos relacionados con las superficies epiteliales como desordenes crónicos inflamatorios de la piel (psoriasis y dermatitis atópica) y enfermedad inflamatoria intestinal. Además, contribuyen a la supervivencia y progresión de tumores mediante la recirculación de DCs inmaduras asociadas al tumor, y al reclutamiento de DCs y linfocitos T memoria/efectores al sinovio inflamado de pacientes con artritis reumatoide (286).

➤ **CXCR3:** pertenece a la familia de los receptores de 7 dominios transmembrana, sus ligandos principales son IP-10, Mig e I-TAC, aunque este último induce la migración de linfocitos T activados con mayor potencia y eficacia. Son antagonistas de CCR3 y compiten con la eotaxina inhibiendo la migración de células Th2 (250, 295).

Durante la *linfopoiesis*, los ligandos IP-10, Mig e I-TAC se expresan en células epiteliales del timo mientras que el CXCR3 lo hace en timocitos de áreas medulares en diferentes fases de maduración (296). Aproximadamente el 40% de los linfocitos T en reposo expresan un CXCR3 no funcional, pero su activación mediante estimulación con IL2 o señalización mediante el TCR provoca un marcado incremento en la expresión del QR y la respuesta quimiotáctica al ligando, además de una rápida adhesión al endotelio vascular (297, 298, 257). Los *linfocitos T memoria/efectores*, principalmente linfocitos Th1, expresan altos niveles de CXCR3, y su expresión junto con el CCR5, se asocia a una respuesta tipo Th1 característica de patologías inflamatorias o autoinmunes como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la esclerosis múltiple (297, 270, 272, 281, 299). La amplia diversificación de la expresión de CXCR3 en linfocitos T infiltrados, independiente del tipo de tejido, sugiere que este QR no contribuye a la especificidad del homing linfocitario por sí mismo, sino que sus funciones pueden ser más amplias y probablemente relacionadas con situaciones de inflamación aguda (274). La expresión del QR en linfocitos T CD4+ tiene lugar paralelamente al proceso de división celular durante la expansión clonal (273). Sin embargo, la estimulación de esta subpoblación a través del TCR provoca la internalización transitoria del QR posibilitando su recirculación a órganos linfoides (258). El CXCR3 también se expresa en *células NK*, principalmente en la fracción que se adhiere a plástico tras estimulación con IL2 (260), *eosinófilos* (300), y *progenitores hematopoiéticos* CD34+ tras estimulación con GM-CSF (301).

➤ **CXCR4:** proteína de 7 dominios transmembrana acoplada a proteínas G. El SDF-1 es el ligando principal y se encuentra implicado en numerosos procesos de recirculación y adhesión de células del sistema inmune (302). Es un potente quimioattractante de linfocitos y monocitos *in vitro*, y de timocitos y células T maduras tras el proceso de selección y migración al bazo (303, 304), pero no provoca migración de linfocitos B de centros germinales (305). También, induce la migración, mediada por integrinas y proteínas O-glicosiladas, de células CD34+ humanas primarias a través del endotelio de médula ósea (306).

El CXCR4 es un quimiorreceptor clave en procesos de desarrollo y maduración de componentes celulares de la sangre (hematopoyesis), y en el desarrollo fetal de diferentes órganos entre los que destaca el sistema nervioso. También está implicado en la homeostasis y recirculación linfocitaria a órganos linfoides primarios.

Las *células madre* CD34⁺ son una de las principales poblaciones que expresan CXCR4 necesario para la recirculación de progenitores hematopoyéticos de médula ósea a órganos linfoides primarios. El SDF-1 promueve la proliferación de precursores CD34⁺ aumentando el porcentaje de células en fase S+G2/M, la supervivencia y la expansión de colonias (307). Algunos autores sugieren una repoblación de médula ósea independiente de CXCR4, basándose en una distribución homogénea del receptor en los diferentes linajes y una ausencia de diferencias en la capacidad proliferativa entre precursores CD34⁺CXCR4⁺ y CD34⁺CXCR4⁻ (308). Sin embargo, otros estudios muestran una correlación entre los niveles de expresión del receptor y diversas moléculas de adhesión, y la movilización de precursores CD34⁺, una disminución de los niveles provoca la liberación de estos precursores a sangre periférica (309). Por otro lado, los pacientes con un *recovering* más alto, tras el autotransplante de médula ósea, poseen células CD34⁺ con una alta tasa de migración espontánea e inducida por SDF-1, aunque su capacidad migratoria se mantiene por debajo de la observada en donantes sanos para transplante alogénico (310).

El CXCR4 y su ligando son esenciales en la colonización de médula ósea por progenitores mieloides durante la embriogénesis, y en la linfopoiesis y mielopoiesis durante el estadio adulto; además, contribuyen a la reconstrucción a largo plazo de la médula ósea en adultos (311, 312). También regula la maduración de timocitos (313) y retiene precursores del linaje B en el hígado fetal y médula ósea para su maduración (314). Las células B expresan CXCR4 mientras crecen en el folículo, durante la respuesta extrafolicular experimentan señalización a través de BCR y CD40 y pierden su respuesta a SDF-1 (315, 305, 289). La *mielopoiesis* es otro proceso en el cual se encuentra implicado el CXCR4, durante la maduración en hígado fetal, se incrementa en el linaje granulocítico, y en modelos animales un SDF-1 no funcional provoca un drástico descenso de granulocitos en médula ósea tras la reconstitución (314, 312).

Dentro de las *poblaciones linfocitarias* de sangre periférica, el CXCR4 contribuye a la recirculación hacia órganos linfoides y se expresa en timocitos, linfocitos T y B naïve, linfocitos Th1 y células NK (279, 316, 257, 270, 260). La señalización a través del TCR de linfocitos

T provoca la internalización del CXCR4 y la disminución de la respuesta quimiotáctica, mientras que la unión al ligando, SDF-1, inhibe parcialmente la señalización vía TCR (317). La expresión del QR en linfocitos T tiene lugar paralelamente al proceso de división celular durante la expansión clonal (273), además se regula positivamente en presencia de IL2, junto con el aumento del índice de migración frente a SDF-1 (275). El CXCR4 se expresa de manera constitutiva y es funcionalmente activo en *células endoteliales* procedentes venas del cordón umbilical y de microvasculatura (302, 318). En otras poblaciones, la expresión del QR esta regulada positivamente por diferentes estímulos principalmente citoquinas: en *células dendríticas*, durante la maduración mediada por LPS y TNF α (262, 203) y en *eosinófilos* por citoquinas (IFN- γ , TNF- α y TGF- β) (319). Recientes estudios revelan la expresión de CXCR4 en *plaquetas* y la inducción de la activación y agregación plaquetaria por SDF-1 (320, 321).

El CXCR4 no sólo esta implicado en procesos hematopoyéticos, también participa en el desarrollo de otros tejidos controlando la migración y redistribución de precursores a las zonas anatómicas y funcionalmente correctas. Los ratones deficientes en CXCR4 muestran alteraciones graves en la hematopoesis, cardiogénesis y letalidad en el útero (302). Durante el *desarrollo fetal del sistema nervioso*, la expresión de CXCR4 por neuronas y astrocitos fetales regula la migración a las diferentes zonas del sistema nervioso central, tras el nacimiento las células granulares de la capa granular externa migran desde la superficie del cerebelo, a través de la capa de Purkinje, a la capa granular interna (322, 323, 302, 282). Los estudios realizados en *epitelio alveolar* revelan que la expresión de CXCR4 esta restringido a células epiteliales alveolares tipo II, estas células son progenitores y se diferencian a células alveolares tipo I durante el *desarrollo del pulmón*. También hay evidencias de la expresión de este QR en células indiferenciadas de criptas en *glándulas colónicas* que se reduce en células más diferenciadas del *villus* (302).

Los estudios sobre la implicación del CXCR4 en el desarrollo y progresión de la enfermedad se centran fundamentalmente en el HIV, ya que actúa como co-receptor, junto con el CCR5 y el CD4, en la fusión de la envoltura viral y posterior penetración del virus en linfocitos T CD4⁺ (283, 285). Además, la expresión de CXCR4 en células cancerígenas junto con las propiedades angiogénicas del SDF-1 constituye un factor clave en la progresión del tumor en cáncer de pulmón y ovario, diversas leucemias y linfomas (265, 324, 325)

2.3.3. Expresión secuencial de quimiorreceptores (multistep navigation) en el desarrollo, maduración, recirculación y activación de componentes del SI

La expresión secuencial de QRs con un patrón específico es un punto crítico en la mayoría de los procesos de desarrollo, maduración y activación del sistema inmune.

Durante el *desarrollo y maduración* de los *linfocitos T*, los timocitos dobles negativos (CD4-CD8-) y dobles positivos (CD4+CD8+) que migran al timo son CXCR4+, tras la selección positiva hacia CD4+ o CD8+ regulan negativamente su expresión y expresan CCR4, esto permite su migración hacia el epitelio medular tímico donde completan su maduración (236, 326). La migración final fuera del timo de los linfocitos T maduros hacia nódulos linfoides requiere la expresión de CCR7 y la re-expresión de CXCR4 (327). Por otro lado, la mayoría de las células T memoria cutáneas expresan CCR4 pero no las encontradas en mucosa intestinal expresan CCR4 (327).

Los *linfocitos T naïve* y *linfocitos T memoria centrales* (T_{CM}) expresan CCR7 que guía su extravasación hacia las áreas ricas en células T de los nódulos linfoides, tras su activación por APCs pierden la expresión de CCR7, transformándose en *linfocitos T efectores* de vida corta que recirculan a los focos de inflamación o infección, o *linfocitos T memoria efectores* (T_{EM}) que pasan a la circulación y cuya capacidad de respuesta antigénica es mucho mayor que un linfocitos naïve (203, 328). Una subpoblación de células T CD4+ expresan CXCR5 y recirculan hacia áreas de células T en los folículos linfoides para colaborar en la maduración y activación de células B, son las células T colaboradoras foliculares (326, 327, 329, 330).

En el *desarrollo* de *células B*, la fase en la cual se define el linaje de células B esta caracterizada por una respuesta a CCL25, una quimioquina que atrae una subpoblación de linfocitos T en la periferia, pero esta capacidad se pierde rápidamente durante el paso a célula pro-B al tiempo que se expresan CXCR5 y CCR7. Durante el paso de célula pro-B a célula pre-B se regula negativamente el CXCR5 pero se mantiene la expresión de CCR7. En el paso final a célula B inmadura aumenta la expresión de CCR7 y se re-expresa CXCR5, lo que garantiza la recirculación a nódulos linfoides y, más específicamente, folículos de centros germinales para su maduración y activación (290). Las *células B* maduras *naïve* expresan altos niveles de CCR6, CCR7, CXCR4 y CXCR5, que les permite migrar hacia áreas de células T en los folículos; la expresión se mantiene tras su activación, pero durante la respuesta extrafolicular las *células plasmáticas* regulan negativamente CCR7 y CXCR5, y pierden la capacidad de migración a SDF-1 mediada por CXCR4 (288, 289, 236, 326, 327).

Las *células dendríticas* inmaduras expresan CCR6, principalmente las células de Langerhans (331), o CCR2 y CCR5 (receptores para quimioquinas inflamatorias), DCs que derivan de monocitos (203, 263), y recirculan como “centinelas” por órganos no linfoides (piel y mucosas). Una vez que entran en contacto con el antígeno sufren un proceso de maduración durante el cual regulan negativamente estos QRs y expresan CCR7, este cambio controla su recirculación a nódulos linfoides donde actúan como APCs en la activación de linfocitos T (194, 203, 233, 236). Una subpoblación de DCs en piel expresa CXCR5 tras su maduración y recircula hacia áreas de células B en nódulos linfoides regionales, allí contribuyen a la activación de linfocitos B (236, 327).

El CCR7 y CXCR5 se expresan diferencialmente en linfocitos y células dendríticas dependiendo del estadio de diferenciación celular y activación (332). Sin embargo, algunos autores se han planteado la veracidad de este paradigma en la recirculación organo-específica de células T, ya que los experimentos *in vivo* mediante inyección de células T naïve CCR7+ y células T efectoras CCR7- en ratones muestran la localización de ambas subpoblaciones tanto en órganos linfoides primarios como en órganos no-linfoides (piel o intestino) (333).

En la *polarización de los linfocitos T efectores*, el patrón de migración de las subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2 es diferente y esta controlado en parte por la expresión de diferentes quimiorreceptores (234, 235). Los primeros estudios apuntaron hacia una expresión preferencial de CCR5 y CXCR3 por los linfocitos Th1 en el contexto de una respuesta inflamatoria infecciosa o autoinmune y de CCR3 y CCR4 por los linfocitos Th2 asociados a una respuesta inflamatoria alérgica, otros quimiorreceptores como el CCR2 y CXCR4 son expresados por ambas subpoblaciones (329, 330, 270, 271). Por otro lado, otros autores sugieren una distribución más flexible del patrón de expresión de los quimiorreceptores, basándose en diversos estudios *in vivo* e *in vitro* que muestran una expresión secuencial de diferentes quimiorreceptores, tanto en Th1 como en Th2, dependiendo del momento y tipo de la respuesta inflamatoria (203, 272, 334).

2.3.4. Moléculas coestimuladoras

➤ **CD28:** es una glicoproteína, miembro de la superfamilia de las Igs. Se expresa en aproximadamente el 95% de los linfocitos T CD4+ y el 50% de los linfocitos T CD8+ de sangre periférica, siendo estos últimos precursores de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (335, 336). La señalización a través de CD28 contribuye a estabilizar los ARNm de citoquinas

(principalmente IL2) (337, 338) y constituye una segunda señal coestimuladora, independiente de la señalización a través del TCR/CD3, necesaria para una completa activación (193, 339). La ausencia de esta señal provoca un estado de anergia o induce la delección por apoptosis siendo uno de los mecanismos principales de auto-tolerancia frente antígenos propios (340). Sus ligandos **CD80** (B7/B7.1) y **CD86** (B7/B7.2) se expresan en APCs, el primero se induce tras activación mientras que el segundo se expresa constitutivamente con bajos niveles y su expresión aumenta rápidamente. El **CD80** forma dímeros y se une de forma bivalente al **CD28** mientras que el **CD86** suele tener estructura monomérica y establece uniones monovalentes, pero, en principio, presentan igual capacidad de coestimulación. Sin embargo, actualmente se postula una mayor eficacia del **CD86** como ligando de **CD28** por oposición al **CD80** como posible ligando funcional del **CD152** (CTLA-4), un homólogo de **CD28** con capacidad inmunosupresora (341-343).

➤ **CD152 (CTLA-4)**: es una molécula coestimuladora homóloga del **CD28** cuya señalización en linfocitos T provoca una señal inhibidora que induce un estado anergia (344, 345). La expresión de **CD152** es inducible, los linfocitos T naïve o en reposo apenas lo expresan, aumentando rápidamente tras la activación de la célula. La excepción a la regla la constituye una pequeña subpoblación de linfocitos T **CD4+CD25+** (5-10% de linfocitos T **CD4+** circulantes) con actividad reguladora o inmunosupresora que expresan **CD152** de forma constitutiva (342, 343). Comparte ligandos con el **CD28** aunque su afinidad es hasta 100 veces mayor dependiendo del ligando; el **CD80** es el ligando de mayor afinidad y varias líneas de estudio sugieren una mayor funcionalidad de este ligando en la inhibición linfocitaria frente a **CD86** (346, 342). El **CD152** se opone funcionalmente al **CD28** compitiendo por los ligandos, debido a su mayor afinidad, y por las kinasas, a través de vías de señalización comunes; alterando la transducción de señales a través del TCR, y bloqueando el ciclo celular (343). El **CD80** es expresado por las APCs activadas posteriormente a la expresión de **CD86**; es probable que, en ausencia de estímulos inflamatorios que inducirían la rápida expresión de **CD86** y la consiguiente activación de linfocitos T a través de **CD28**, prevalezca la interacción **CD80-CD152** constituyendo un mecanismo de auto-tolerancia por inhibición de las señales de activación o regulación de linfocitos T reguladores. Así mismo, la expresión preferencial del **CD80** en DC inmaduras, frente al **CD86** en DCs maduras, podría constituir una vía de tolerancia inmunogénica frente a auto-antígenos mediada por estas APCs no funcionales (343).

➤ **CD40:** pertenece a la familia de los receptores del TNF y se expresa en una amplia variedad de células tanto linfoides como no linfoides que incluye linfocitos B maduros, DCs, DCs foliculares, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales. Su ligando, el **CD154** (CD40L), se expresa en linfocitos T activados. La señalización mediada por CD40-CD40L en el contacto célula-célula juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune (347, 348). Se requiere para la generación de la respuesta humoral timo dependiente mediada por linfocitos B y T; la unión de CD40 a CD40L (expresado en linfocitos T), induce la activación y proliferación de linfocitos B, aumenta su capacidad de presentación antigénica, promueve el cambio de isotipo de Ig, y contribuye al desarrollo de los centros germinales y la supervivencia de linfocitos B memoria de alta afinidad para el Ag (208). El CD40 actúa en la respuesta inmune adaptativa mediante la interacción de linfocitos T y DCs; cuando la DCs entran en contacto con el patógeno aumentan la expresión de CD40 y migran nódulos linfoides, donde interaccionan recíprocamente con linfocitos T CD4+ activados MHC restringidos mediante el CD154. El linfocitos T induce la diferenciación de la DC definida por un incremento de MHC, moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión; por su parte, la DC promueve la polarización hacia Th1 de linfocitos T CD4+ mediante la secreción de IL12, y aumenta la proliferación de linfocitos T CD8+ y células NK activadas (349). En la inmunidad frente a patógenos mediada por linfocitos T CD8+, el mantenimiento de una alta frecuencia de linfocitos antígeno específico es considerablemente dependiente de la interacción CD40-CD154, sin embargo, en ratones deficientes CD40/CD154 o en estudios *in vitro* sobre el bloqueo de la señalización mediada por CD40 se mantienen linfocitos T respondedores (350). La implicación de estas moléculas coestimuladoras en la inmunidad humoral y mediada por células constituye una posible vía de inmunoregulación en respuestas autoinmunes y de rechazo frente a transplantes alógenos y xenogénicos, el bloqueo de CD154 induce tolerancia antígeno específica de larga vida (351).

2.3.5. Marcadores de activación

➤ **CD45:** pertenece a un grupo de glicoproteínas comúnmente denominadas LFA y se expresa en todas las células de origen hematopoyético, excepto los eritrocitos (352). El *splicing* alternativo de 3 exones que codifican para la secuencia aminoterminal genera varias isoformas cuya expresión establece una diferenciación funcional de las diversas subpoblaciones de linfocitos T (352-354). Regula la transducción de señales y la activación de linfocitos T y B (355, 356). Tradicionalmente, la expresión de la isoforma **CD45RA** se ha

asociado a linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que no han tenido contacto con el Ag, *linfocitos T naïve* (357, 358), mientras que la isoforma **CD45RO** se expresaba preferencialmente en linfocitos T activados, *linfocitos T memoria/efectores* (359). La activación *in vivo* o *in vitro* de linfocitos T naïve condiciona el intercambio gradual de la isoforma CD45RA por la isoforma CD45RO y el paso a linfocitos T memoria/efectores (360, 361). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos implicados en la diferenciación, maduración y homeostasis linfocitaria, junto con el descubrimiento de nuevos marcadores linfocitarios, ha ampliado el concepto clásico de linfocitos T naïve y memoria.

Actualmente, los *linfocitos T naïve* se caracterizan por la expresión de CD45RA junto con otros marcadores y moléculas de adhesión (CD27, CD62L, CD11a^{low} y CCR7) que posibilitan su recirculación a nódulos linfoides (328, 222, 223). Tras su activación por el Ag sufren un proceso de expansión clonal y se transforman en linfocitos T efectores, que mantienen la expresión de CD45RA, o linfocitos T memoria que pierden la expresión de CD45RA y expresan CD45RO (362, 363). Los *linfocitos T efectores* (CD45RA+CD11a^{high}CD27-), migran a los tejidos inflamados, son células de vida corta, secretan citoquinas (IFN γ y TNF α) y tienen gran capacidad citotóxica (linfocitos T CD8⁺) (362, 363). Los linfocitos T memoria incluyen dos subpoblaciones con características fenotípicas y funcionales diferentes: los *linfocitos T memoria centrales* T_{CM} (CD45RA-CD45RO+CD27+CCR7+CD62L+), células de vida larga que mantienen la expresión de moléculas de adhesión para recircular a nódulos linfoides, y cuya capacidad y potencia de respuesta ante una nueva estimulación antigénica es mucho mayor que la desarrollada por linfocitos naïve (362, 364, 365, 366); y *linfocitos T memoria efectores* T_{EM} (CD8+CD45RA+CD27-CCR7- y CD4+CD45RA-CD27-CCR7-), con características de célula efectora y célula memoria (vida larga, mejor y más rápida respuesta antigénica, capacidad citotóxica y producción de citoquinas), que permanecen recirculando por tejidos periféricos para controlar la entrada de patógenos (364, 366, 367, 368).

➤ **Receptor de interleuquina 2 (IL2R):** el IL2R de alta afinidad está compuesto por tres subunidades, IL2R α (CD25), IL2R β (CD122) e IL2R γ (CD132). La subunidad α es un importante modulador de afinidad esencial para la respuesta efectora *in vivo* de linfocitos T, pero no contribuye a la señalización debido a su corta cola citoplásmica. La transducción de señales se lleva a cabo por la acción conjunta de las subunidades β y γ , aunque la mayoría de las vías de señalización conocidas conectan con la subunidad β (369).

El **CD25** se considera un marcador temprano de activación en linfocitos T, y su expresión se induce *in vivo* por citoquinas o virus (369). En la última década este marcador ha cobrado gran importancia por su expresión en una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ con capacidad reguladora e inmunosupresora (linfocitos T_R o Treg). Los linfocitos T_R CD4⁺CD25⁺ constituyen el 10% de los linfocitos CD4⁺, son seleccionados positivamente en el timo por alta afinidad contra Ag propios y no proliferan en respuesta a estímulos policlonales ni producen IL2 en cultivos *in vitro*. Son capaces de suprimir la respuesta efectora de linfocitos T mediante contacto célula-célula independientemente de la secreción de citoquinas y reducen la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en DCs y células B (370, 371). Su supervivencia y proliferación *in vivo*, en el pool de células recirculantes, esta condicionada por la presencia de Ag específico, los linfocitos T_R CD4⁺CD25⁺ antígeno-específicos no suprimen la activación inicial pero previenen la expansión clonal posterior de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ (371). Estas células contribuyen al mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica y el control negativo de la respuesta inmune, y por lo tanto, tienen un papel clave en las respuestas patológicas inmunes inducidas por flora entérica o infección bacteriana, las enfermedades autoinmunes, la tolerancia frente a transplante, o la tolerancia materna al feto (371, 372).

El **CD122** se expresa constitutivamente en linfocitos CD8⁺ citotóxicos (478) y caracteriza a la subpoblación de linfocitos T memoria efectores junto con CD44 (CD8⁺CD122⁺CD44^{hi}). El receptor de la interleuquina 15 (IL15R) comparte con el IL2R las subunidades IL2Rβ e IL2Rγ, la IL15 contribuye al mantenimiento y supervivencia durante la recirculación normal a tejidos linfoides, e induce la proliferación en respuesta a agentes infecciosos de linfocitos T CD8⁺ que expresan CD122 (linfocitos T memoria) (373-375).

➤ **CD38**: es una glicoproteína transmembrana de tipo II, expresada por la mayoría de leucocitos en diferentes fases de maduración y activación, que posee características mixtas de enzima y receptor. Tiene actividad ectoenzimática en la síntesis de ADPribosa cíclica (componente implicado en la movilización de Ca²⁺), actúa como molécula de adhesión implicada en la fase de rodamiento durante la interacción célula endotelial-leucocito, y contribuye a la transducción de señales que desencadenan la activación de linfocitos B, T y células NK mediante su asociación a los principales complejos de señalización (BCR, TCR, CD16) (376, 377). La expresión de CD38 en la población linfocitaria se asocia a efectos muy diversos. En

linfocitos T se expresa predominante en linfocitos T naïve CD45RA+, controlando su recirculación a nódulos linfoides, mientras que en *linfocitos B* sus efectos varían en función del estadio de maduración, bloquea la linfopoiesis e induce la apoptosis en linfocitos B inmaduros y promueve la proliferación en linfocitos B maduros (376, 377). Por otro lado, la señalización de este marcador asociado a CD16 activa a la *célula NK* aumentando su capacidad lítica (377, 378). También se expresa en timocitos dobles positivos durante su maduración en el timo contribuyendo a la delección clonal mediada por APCs, en monocitos en reposo, y en DCs derivadas de monocitos (379, 380).

El CD38 es un receptor implicado en la patogénesis de diversas enfermedades pero son de especial relevancia las leucemias, LLC-B y AML, donde actúa como un marcador pronóstico negativo en la progresión del tumor, y en la infección por HIV donde se asocia a la progresión de la enfermedad en individuos con replicación viral descontrolada y a un aumento de la apoptosis en linfocitos T CD8+CD38+ responsable en parte de la capacidad citolítica ineficiente para erradicar el virus (377, 381, 382).

➤ **CD69:** es un homodímero, perteneciente a la familia de las lectinas tipo C, formado por dos glicoproteínas de membrana tipo II. Se expresa constitutivamente en timocitos CD3^{bright}, monocitos, plaquetas y algunas poblaciones de linfocitos periféricos (células inmunes de mucosa y células de lavado broncoalveolar). En *monocitos*, la señalización de CD69 induce la liberación de mediadores inflamatorios y NO, mientras que en *plaquetas* induce la agregación plaquetaria (384, 385). Durante su maduración en el timo, el CD69 se expresa en timocitos inmaduros en diferentes estadios de maduración (CD4+CD8+, CD4^{lo}CD8+ y CD4+CD8^{lo}, CD4+CD8- y CD4-CD8+), y se encuentra implicado en el proceso de selección positiva restringido por MHC propio, tras su maduración pierden su expresión tan pronto como abandonan el timo. También se ha detectado la presencia de CD69 en aproximadamente el 20% de los timocitos humanos postnatales CD4-CD8-CD3- (383, 384, 385).

En la población linfocitaria, el CD69 es un marcador temprano de activación (1-2h tras la activación) y su expresión se mantiene estable varios días. En *linfocitos T* y *B* se expresa tras activación a través de TCR o BCR respectivamente, o con estímulos policlonales (PHA, PMA), y aumenta la proliferación en células coestimuladas e induce la expresión de CD25 en linfocitos T. La activación de *células NK* por citoquinas (IL2, IFN γ , IL7, IL12), PMA o a través de CD16 induce la expresión de CD69, y es capaz de mediar la lisis dirigida contra la célula diana. La expresión de CD69 también es inducible en *neutrófilos* y *eosinófilos* mediante

estimulación con GM-CSF. Sin embargo, la señalización de esta molécula en monocitos y eosinófilos activados induce la apoptosis contribuyendo a la regulación *in vivo* de estas células, previniendo su acumulación y liberación de productos tóxicos (384, 385).

Las enfermedades caracterizadas por la infiltración de linfocitos (rechazo frente al trasplante, hepatitis crónica, artritis reumatoide), monocitos (demencia asociada a HIV), o eosinófilos (asma), se asocian a la expresión de CD69 (384, 385).

➤ **CD71:** es el receptor de transferrina, una proteína sérica transportadora de hierro. Cada receptor capta dos moléculas y dirige la incorporación de hierro a la célula mediante su internalización por endocitosis. El CD71 es un marcador de activación que se expresa en *linfocitos T*, tras estimulación con antígenos o mitógenos, y cuya función es la incorporación de hierro extracelular para las necesidades metabólicas durante la proliferación (386, 387). En *macrófagos* del sistema reticuloendotelial, como las células de Kupffer, la expresión de este receptor cumple una importante función en el metabolismo del hierro mediante la fagocitosis de eritrocitos senescentes, el procesamiento del hierro unido a la hemoglobina y su transferencia a la transferrina plasmática (387). Recientemente se ha descubierto que el CD71 une selectivamente IgA₁ y su expresión se encuentra aumentada en células mesangiales en cultivo *in vitro* y en glomérulo renal de pacientes con nefropatías. La expresión de este receptor por las células mesangiales contribuye a la formación y depósito de inmunocomplejos de IgA circulantes en el glomérulo, lo que sugiere una posible implicación en la patogénesis de las nefropatías de IgA (IgAN) (Enfermedad de Berger y Púrpura de Henoch-Schönlein) (388-390).

➤ **HLA-DR:** es uno de los grupos de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (ver sección 2.1. y 2.2.4.). Está considerado como un antígeno de activación tardío pues aparece en los linfocitos tras su entrada en fase S del ciclo celular (391).

➤ **CD95 (Fas):** el receptor Fas y su ligando FasL (CD95L) pertenecen a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral / receptor del factor de crecimiento neuronal (TNFR/NGFR) y del TNF/NGF respectivamente, y están implicados en uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo y la regulación del sistema inmune: la **apoptosis**. La muerte celular por apoptosis se produce en numerosos procesos fisiológicos y patológicos como el desarrollo, la diferenciación, la muerte de células diana mediada por células T o NK, la erradicación de patógenos, tumorigénesis, los desórdenes autoinmunes, o la inducción de tolerancia (392-394). La apoptosis puede desencadenarse por activación de dos vías, la *vía*

intrínseca o mitocondrial mediada por la liberación de citocromo c y su posterior interacción con APAF-1 y pro-caspasa 9 (apoptosoma) que activa la cascada de caspasas; y la *vía extrínseca o mediada por receptor*, a la que pertenece el sistema Fas/FasL, que activa la vía de las caspasas a través de dos moléculas adaptadoras (TRADD y FADD) y su interacción con pro-caspasas 8 o 10. No obstante, la activación de la pro-caspasa 8 mediada por Fas/FasL escinde una proteína (BID) que, una vez translocada a la mitocondria, libera citocromo c e inicia la vía intrínseca de la apoptosis (393, 395).

El receptor CD95 esta presente en una amplia variedad de células pero su expresión es predominante en timocitos, linfocitos T activados, y en órganos muy irrigados como hígado, corazón y riñón. Su ligando CD95L, sin embargo, tiene una distribución mucho más restringida, se expresa en linfocitos T citotóxicos, células NK y en dos tejidos inmunológicamente privilegiados, la retina y el testículo. Además su expresión es inducida en linfocitos T CD4+ y CD8+ maduros tras activación (396, 397). La apoptosis de células T inducida por señalización de TCR es un proceso clave en la eliminación de timocitos autorreactivos durante el desarrollo (selección negativa) y de linfocitos T expandidos clonalmente durante la respuesta inmune mediada por células (394). La expresión de CD95 aumenta en linfocitos T y B tras activación mediada por el receptor (398).

2.4. COMPONENTES MOLECULARES DEL SISTEMA INMUNE

2.4.1. Citoquinas

Las **citoquinas** son factores solubles no antígeno específicos de **carácter pleitrópico** liberados principalmente por leucocitos, y que constituyen una vía esencial de interacción entre los diferentes tipos celulares del sistema inmune, y entre este y el resto del organismo. Las citoquinas intervienen en el desarrollo del sistema inmune controlando la proliferación y movilización de células madre hematopoiéticas, así como de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T que participan en la respuesta inmune (naïve, memoria central y memoria efectora) (399, 400) (**Tabla 2.4.1.**). En los procesos patológicos, la IL12 y el IFN γ , son imprescindibles en la polarización de linfocitos T hacia Th1 y la activación de los macrófagos durante la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares (virus y bacterias) (401). Así mismo, la señalización mediada por contacto entre linfocitos T estimulados y monocitos durante la presentación antigénica induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IL1 y

TNF α . Estos mecanismos proinflamatorios tienen gran relevancia en la patogénesis de desórdenes inflamatorios crónicos (402).

Una de las principales funciones de las citoquinas es mediar las interacciones entre el sistema inmune y el inflamatorio, se cree que las enfermedades crónicas inmunoinflamatorias son causadas en parte por la producción incontrolada de citoquinas. Dependiendo de la fase inflamatoria y el efecto biológico, la misma citoquina podría ser pro o anti-inflamatoria (IL4, IL10 y TGF β). Uno de los mecanismos más importantes es la inducción de citoquinas proinflamatorias como consecuencia de la interacción célula a célula entre linfocitos T estimulados y monocitos-macrófagos, a su vez los niveles de citoquinas, inhibidores de citoquinas y proteínas de fase aguda están controlados por hormonas. Las citoquinas también controlan el eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal así como de las hormonas sexuales (403).

El sistema neuroendocrino también se encuentra muy relacionado con la regulación de la red de citoquinas y el balance entre respuestas Th1 y Th2. Los mediadores neuroendocrinos (glucocorticoides, norepinefrina, epinefrina, histamina y adenosina) inhiben la producción de IL12 y TNF α , citoquinas que promueven la polarización de linfocitos T hacia Th1, y no afectan o incluso estimulan la producción de IL10, una citoquina asociada a respuesta inmune humoral y Th2. En situaciones de stress (stress crónico o agudo, trauma, quemaduras, ejercicio intenso, isquemia, embarazo y postparto) la liberación de histamina y adenosina provocan un desbalance potenciando la respuesta Th2 e inhibiendo la respuesta Th1 que incrementa la susceptibilidad del organismo a padecer infecciones por un lado y reacciones alérgicas/atópicas, enfermedades autoinmunes y procesos tumorales por otro (404).

Aunque se sigue conservando el concepto de *red de citoquinas* como reguladores del balance Th1 y Th2 adscrito principalmente a linfocitos T efectores, en los últimos años se tiende a una concepción más amplia de la polarización hacia Th1 o Th2 en la que intervienen diferentes poblaciones (linfocitos T, DCs, macrófagos, células NK) que producen *campos de citoquinas* como resultado de la interacción entre ellas, y que afecta tanto a linfocitos naïve como diferenciados. En un contexto patológico, la prevalencia de unos campos de citoquinas frente a otros promueve una respuesta Th1 o Th2, pero también regulan procesos fisiológicos como el desarrollo de órganos linfoides y maduración de linfocitos, monocitos y DCs (405).

El conocimiento de los mecanismos de acción fisiopatológicos de las citoquinas ha adquirido gran importancia en el desarrollo de futuras terapias con mínimos efectos secundarios. La inmunoterapia mediante citoquinas anti-inflamatorias y antagonistas de

citoquinas constituye una nueva área de investigación en el tratamiento de enfermedades cuyo posible origen reside en una excesiva respuesta inmune mediada por citoquinas proinflamatorias (síndrome de sepsis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal) (406).

Tabla 2.4.1.: Citoquinas, principales actividades y patrón de secreción

CITOQUINA	POBLACIÓN CELULAR PRODUCTORA	PRINCIPALES ACTIVIDADES	PATRÓN DE SECRECIÓN	
			Th1	Th2
IL1	Macrófagos	Activación de células T y macrófagos, actividad pro-inflamatoria	+	-
IL1RA	Neutrófilos	Antagonista del receptor de la IL1, actividad anti-inflamatoria	+	-
IL2	Células Th1	Activación de linfocitos, células NK y macrófagos	++	-
IL4	Células Th2, mastocitos, basófilos y eosinófilos	Activación de linfocitos, monocitos y cambio de isotipo a IgE en células plasmáticas	-	++
IL5	Células Th2, mastocitos y eosinófilos	Diferenciación de eosinófilos	-	++
IL6	Células Th2 y macrófagos	Activación de linfocitos, diferenciación de células B, estimulación de la producción de proteínas de fase aguda, actividad pro-inflamatoria	-	+
IL8	Células T y macrófagos	Quimiotaxis de neutrófilos, basófilos y células T	-	+
IL10	Células T, células B y macrófagos	Supresión de las funciones efectoras de los macrófagos, linfocitos T y NK, activación de linfocitos B. actividad anti-inflamatoria	+	++
IL11	Células estromales de la médula ósea	Estimulación de proteínas de fase aguda		
IL12	Macrófagos y células B	Estimulación de la producción de IFN γ por células Th1 y células NK, polarización de células Th1, aumento de la producción de TNF α (407)	+	-
IL15	Monocitos activados, células dendríticas y fibroblastos	Interacción entre linfocitos T y macrófagos, activación de células T efectoras, células NK, células B, neutrófilos y mastocitos, polarización de células Th1, efectos proinflamatorios sobre células endoteliales (408).	+	-
IL18	Células de Kupffer, macrófagos, células T, células B, DCs, osteoclastos, queratinocitos, microglia.	Aumenta la actividad citotóxica de células T y NK mediante la inducción de IFN γ , GM-CSF, TNF α e IL1, polarización de células Th2 (409)	+	+
TNFα	Macrófagos, células NK, células T, células B y mastocitos	Actividad pro-inflamatoria	++	+
TNFβ	Células Th1 y células B	Actividad pro-inflamatoria	++	-
TGFβ	Células T, macrófagos, células B y mastocitos	Inmunosupresión		

Tabla 2.4.1.: Citoquinas, principales actividades y patrón de secreción (continuación)

CITOQUINA	POBLACIÓN CELULAR PRODUCTORA	PRINCIPALES ACTIVIDADES	PATRÓN DE SECRECIÓN	
			Th1	Th2
IFNα	Células infectadas por virus	Inducción de la resistencia de células a la infección viral	+	-
IFNβ	Células infectadas por virus	Inducción de la resistencia de células a la infección viral	+	-
IFNγ	Células Th1 y células NK	Activación de macrófagos, inhibición de células Th2	++	-
GM-CSF	Células T, macrófagos, células NK y células B	Promoción del crecimiento de granulocitos y monocitos	+	++

IL: interleuquina; **TNF:** factor de necrosis tumoral; **TGF:** factor de crecimiento tumoral; **IFN:** interferón; **GM-CSF:** factor estimulador de colonia de macrófagos-granulocitos, **DCs:** células dendríticas

➤ **Interleuquina-1 (IL1):** existen dos subtipos diferentes, IL1 α e IL1 β , que actúan a través de receptores con actividades biológicas similares, IL-1RI (CD121a) e IL-1RII (CD121b). El receptor de la IL1 (IL1R) pertenece a la familia de los TLR implicados directamente en la inmunidad innata mediante el reconocimiento no antígeno específico de componentes bacterianos, virus y protozoos. La subfamilia de IL1R engloba moléculas transmembrana (IL1R tipo I y II, IL1RAcP) y formas solubles, se caracteriza por poseer dominios extracelulares de Ig y colas citoplásmicas con dominios TIR (IL1R II carece de dominios TIR), y comparte con la familia de TLR la utilización de proteínas de señalización como MyD88/IRAK. El IL1R I reconoce IL1 α , IL1 β y el antagonista del receptor, IL1RA, y mediante su interacción con IL1RAcP forma un complejo heterodimérico de reconocimiento de IL1 en el que ambas moléculas se requieren para la iniciación de la señal de transducción (410, 411).

La IL-1 es segregada de forma inducible por múltiples tipos celulares, con especial predominancia de monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliales y células gliales. Los monocitos y los macrófagos secretan IL-1 en respuesta a productos bacterianos y citoquinas proinflamatorias (TNF α e IFN γ) (412). La IL1RA es una proteína antagonista, descubierta por Dinarello y cols, que inhibe las actividades biológicas de la IL-1 α y de la IL-1 β compitiendo por sus receptores (413). La IL1 tiene funciones inmunoregulatoras a bajas concentraciones, induciendo la activación, proliferación, crecimiento y diferenciación de linfocitos, la producción de citoquinas y receptores y la adhesión linfocitaria a través de células endoteliales. Sin embargo, a concentraciones mayores; tiene efectos sistémicos como fiebre y síntesis de proteínas de fase aguda (414).

El estudio del balance entre la producción de las dos isoformas de la IL1 y el IL1RA en procesos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal es un punto clave en el desarrollo de futuras inmunoterapias (406, 415). Aunque las evidentes cualidades proinflamatorias de la IL1 la relacionan preferentemente con situaciones patológicas de inflamación crónica, también tiene especial relevancia en la biología y patología del sistema nervioso central y en la interacción huésped-tumor. Su producción se induce rápidamente en células cerebrales y macrófagos infiltrados como respuesta al daño local y sistémico, y su incremento se ha asociado a epilepsia y enfermedades degenerativas, particularmente esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (416). En los procesos tumorales, la IL1 β tiene un doble efecto estimulante e inhibidor, aumentando la invasividad del tumor en altas dosis, e induciendo el desarrollo de respuesta inmune antitumoral en dosis bajas (417).

➤ **Interleuquina-2 (IL2):** es una proteína monomérica denominada en un principio *factor de crecimiento de linfocitos T* por su capacidad de activar y mantener el crecimiento de los linfocitos T en el cultivo (418). El receptor de alta afinidad IL2R está formado por tres cadenas ($\alpha\beta\gamma$)_(ver sección 2.3.5). Los linfocitos T y B aumentan sensiblemente la expresión de la cadena α tras su activación, lo que fomenta la formación de un mayor número de receptores de alta afinidad (IL2R $\alpha\beta\gamma$), mientras que los macrófagos y linfocitos en reposo expresan niveles menores del receptor de baja afinidad (IL2R α) (419).

La IL2 regula la activación y proliferación de los linfocitos T, y promueve el crecimiento de linfocitos B y su diferenciación a células productoras y secretoras de Igs (420). En la población NK, la IL2 induce proliferación y activación, e incrementa la citotoxicidad y la lisis de células tumorales MHC I negativas. La subpoblación CD56^{bright} expresa constitutivamente el receptor de alta afinidad y es la principal población efectora en respuesta a bajas dosis de IL2, mientras que la subpoblación CD56^{dim} expresa el receptor de afinidad intermedia IL2R $\beta\gamma_c$ que induce un aumento de la citotoxicidad pero limita su respuesta proliferativa (421).

Numerosos estudios sobre las implicaciones fisiopatológicas de la IL2 han demostrado su participación en la regulación de la respuesta inmune a muy diversos niveles y sus beneficios terapéuticos. Alteraciones en la señalización de la IL2 por defecto en la expresión del receptor (CD25) en linfocitos T CD4⁺ circulantes, y/o de su producción durante la selección tímica de precursores de linfocitos T $\alpha\beta$, se asocia a procesos autoinmunes indicando una importante

función en el mantenimiento de la autotolerancia (ver sección 2.3.5) (422). Por otro lado, el descubrimiento reciente de la producción de IL2 por DCs, tras la estimulación microbiana, señala la importancia crítica de esta citoquina en la respuesta inmune innata y adaptativa derivadas de la invasión por patógenos (423). Su uso clínico está preferentemente orientado a la terapia antitumoral asociada a la quimioterapia como agente potenciador de la respuesta inmune frente al tumor (424). La inmunoterapia con bajas dosis de IL2 que expanden células NK efectoras CD56^{bright} combinada con bolus periódicos que inducen su activación y aumentan la lisis de células tumorales resistentes, constituye una nueva aplicación clínica de esta citoquina con menores efectos secundarios en el tratamiento del cáncer (421).

➤ **Interleuquina-4 (IL4):** es una glicoproteína monomérica producida por linfocitos T activados Th2 (425). Los efectos de la IL4 están mediados por su unión a receptores de alta afinidad (IL4R $\alpha\gamma_c$) expresados tanto por células hematopoiéticas como no hematopoiéticas, cuya cascada de señalización incluye la activación de STAT6. Al igual que la mayoría de las citoquinas presenta un gran pleiotropismo, induce proliferación celular y activación génica y sus efectos se encuentran regulados por IL4R soluble producido de forma regulada por varias células del sistema inmune (426).

La IL4 es una citoquina clave en el desarrollo de la respuesta inmune Th2 característica de infecciones por parásitos, alergia y asma. Regula la proliferación y diferenciación, e induce el cambio de isotipo y la secreción de IgE en células B (427, 428), aumenta la expresión del receptor de baja afinidad de IgE (Fc ϵ R2; CD23) en células B y macrófagos y de alta afinidad (Fc ϵ R1) en mastocitos y basófilos, y es un potente activador de mastocitos (429). Así mismo, contribuye al mantenimiento de la homeostasis, aumenta la supervivencia de linfocitos T naïve (Th0) y promueve su diferenciación en linfocitos T efectores/memoria Th2 (400, 425). En la defensa frente parásitos, la IL4 juega un papel clave en la eliminación de patógenos gastrointestinales, actuando sinérgicamente con otras citoquinas como IL13 e IL5. Sin embargo, en las respuestas alérgicas y asma tiene efectos pro-inflamatorios negativos al inducir la producción de IgE, citoquinas inflamatorias y eotaxina, y la infiltración de células inmunes (basófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos T) (430, 431). El receptor soluble recombinante de IL4 (rhuIL4R) que carece de los dominios de activación actúa secuestrando la IL4 sin mediar activación celular, y constituye un agente terapéutico natural en el tratamiento del asma alérgico y no alérgico (431). En las enfermedades

autoinmunes, en las cuales el fenotipo Th1 pro-inflamatorio se considera esencial en el desarrollo de la enfermedad, la IL4 podría contribuir a la restauración el balance Th1/Th2 mediante la inducción de polarización de respuesta inmune Th2. La terapia con IL4 en pacientes con psoriasis disminuye el índice de gravedad, las placas psoriásicas, la producción de citoquinas implicadas directamente en la patogénesis (IL8 e IL19), y el número de linfocitos Th1 que expresan CCR5 (432).

➤ **Interleuquina-6 (IL6):** es una glicoproteína monomérica producida por diversos tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos, monocitos, células T activadas) con importantes funciones reguladoras en el sistema inmune. El receptor de IL6 (IL6R, CD126) une el ligando con baja afinidad ya que carece del dominio intracelular de transducción, su asociación a una glicoproteína transmembrana, gp130 (Cdw130) formando un heterodímero constituye el receptor de alta afinidad. Su principal vía de transducción incluye activación de JAK kinasas y del factor de transcripción Stat3 (433, 434). El receptor soluble de la IL6 (sIL6R) se une a la IL6 con una afinidad similar a la forma de membrana pero, al contrario del efecto antagónico natural de otros receptores solubles, el complejo sIL6R/IL6 es capaz de estimular células diana que no expresan el receptor mediante su unión a la subunidad de transducción, gp130. Esta señalización atípica se conoce como transeñalización y parece estar implicada en varias enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide y peritonitis (435). La sIL6-R, tiene actividad biológica y ha sido encontrada en fluidos biológicos, se une a moléculas de adhesión y a receptores de citoquinas y factores de crecimiento. Regula los procesos inflamatorios mediante el reclutamiento de leucocitos y la activación de protrómbotica/proinflamatoria de células endoteliales (433).

La IL6 es una citoquina pleiotrópica con actividad proinflamatoria y anti-inflamatoria que actúa sobre una gran variedad de tipos celulares induciendo diferenciación, proliferación y supervivencia de las células diana, además es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y tiene actividad neuroendocrina. En linfocitos B estimula la diferenciación a célula plasmática, la proliferación y la producción de Igs, en linfocitos T induce la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos. También tiene actividad anti-inflamatoria mediante la inhibición de la producción de IL1 y TNF α por macrófagos por un lado y la inducción de la producción de IL1RA por otro (433, 434).

Los niveles elevados de sIL6R se asocian a numerosos procesos patológicos, la destrucción de cartílago en la *artritis reumatoide*, la inducción de apoptosis de células de

lámina propia y la aparición de episodios de colitis en la *enfermedad de Crohn*, y el aumento de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células del mieloma en el *mieloma múltiple* (436). La inhibición terapéutica de IL6 en pacientes con artritis reumatoide de progresión avanzada, refractarios a drogas antireumáticas modificadoras de la enfermedad, reduce la sinovitis y mejora los síntomas (434).

➤ **Interleuquina-10 (IL10):** la IL10 inicia una amplia variedad de actividades cuando se une a su complejo receptor, pero clásicamente se la identifica con la actividad anti-inflamatoria. El complejo receptor pertenece a la familia del receptor de interferon (IFNR) y consta de dos subunidades: una subunidad principal (IL10R1 o IL10R α) que reconoce IL10 con alta afinidad y una subunidad accesoria (IL10R2 o IL10R β) cuya función principal es el reclutamiento de quinasas en la cascada de señalización. IL10R1 se expresa constitutivamente en la mayoría de las células hematopoiéticas en baja proporción pero sufre diferentes mecanismos de regulación dependiendo del tipo celular. También se expresa de forma inducible en varios tipos de células no hematopoiéticas (fibroblastos, queratinocitos) (437).

Originariamente se identificó la IL10 como un producto de células Th2 capaz de inhibir la capacidad de presentación antigénica por macrófagos y células dendríticas (438, 439). Posteriormente se observó que bloqueaba la producción de citoquinas en monocitos, linfocitos T, neutrófilos y eosinófilos, la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y MHCII, y la secreción de CC y CXC-quimioquinas implicadas en el reclutamiento leucocitario en los procesos inflamatorios. También aumenta la expresión de CCR1, CCR2, CCR5, y ligandos para β 2 integrinas (ICAM-1), y la generación de radicales en monocitos y macrófagos (440, 437). La IL10 inhibe la producción de muchas citoquinas y quimioquinas efectoras y aumenta la expresión de sus antagonistas naturales (IL1RA, subunidades p55 y p75 del receptor de TNF soluble) (437). A nivel subcelular, el bloqueo de la vía de señalización de las Ras-MAP quinasas y de la liberación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) por la IL10 controla el daño y la muerte celular contribuyendo al mecanismo anti-inflamatorio característico de esta citoquina (441, 442). Así mismo, la IL10 tiene actividad inmunosupresora mediante la inducción de tolerancia periférica de células T al inhibir la fosforilación del CD28 (443).

Sin embargo, la IL10 también tiene efectos inductores dentro de la respuesta inmune ya que promueve el desarrollo de células B y mastocitos, aumenta la supervivencia de células T y B, la producción de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM), y la actividad de las células NK (437, 440, 444).

La IL10 tiene gran importancia fisiopatológica en la regulación de la respuesta inmune, su deficiencia en modelos experimentales se ha asociado al desarrollo de patología autoinmunes como la enfermedad de Crohn y al incremento de respuestas Th1 (440, 445). Así mismo, limita el daño local y sistémico derivado de la erradicación del agente invasor en la respuesta inmune frente a patógenos, y participa en la tolerancia periférica, principalmente en el reconocimiento de auto-antígenos y antígenos de mucosa, evitando la aparición de enfermedades autoinmunes (437). En los desórdenes atópicos, como la dermatitis atópica y el asma alérgico, la IL10 parece tener efectos contrarios, ya que aunque su sobreexpresión se asocia a una predominancia de la respuesta inmune tipo Th2 característica de estas patologías, su evidente carácter anti-inflamatorio contribuiría a la mitigación de los efectos y por lo tanto su ausencia potenciaría las respuestas alérgicas y asmáticas (445, 446). Actualmente se están ensayando aplicaciones terapéuticas basadas tanto en la administración de IL10 como de bloqueadores de sus efectos (análogos de IL10) en diversas enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn, la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico y la pancreatitis aguda (440, 445, 447, 44). Los resultados preliminares muestran un éxito parcial en la mayoría de los pacientes, y su aplicación a largo plazo podría provocar la aparición de inmunodeficiencias o hiperreactividad inmune, sin embargo, el conocimiento creciente de su mecanismo de acción y la amplia variedad de actividades biológicas mantiene su utilidad terapéutica sola o en combinación con otros agentes (437, 440, 445).

➤ **Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α):** es un heterotrímero que existe en forma libre y también como molécula de membrana, fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo, y causante de necrosis hemorrágica de células tumorales *in vivo* (448). Las principales células productoras de TNF α son los monocitos y macrófagos, en respuesta a toxinas bacterianas (LPS), y tras estimulación por linfocitos T activados mediante el contacto célula a célula y/o la secreción de citoquinas (IFN γ o IL2). Otras células productoras son los linfocitos B y T, células NK, leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, astrocitos, células de Langerhans, y células de Kupffer (402, 407).

El TNF α ejerce su actividad biológica a través de dos receptores, p55TNFR I y p75TNFR II, pertenecientes a la superfamilia del TNFR/NGFR. Estos receptores son expresados por prácticamente todas las células, con excepción de los eritrocitos, lo que amplía enormemente su rango de acción. Ambos receptores unen el ligando con afinidad similar pero inician vías de señalización separadas y poseen diferentes cinéticas de unión. La expresión del TNFR II puede ser inducida, su señalización activa la vía de las caspasas y la expresión de NF-KappaB que promueve el crecimiento y la diferenciación celular. El TNFR I se expresa constitutivamente e induce apoptosis a través de la vía de señalización extrínseca que incluye activación de caspasa 8, liberación de citocromo c y formación del apoptosoma (449, 450, 393). No obstante, algunos estudios muestran evidencias de inducción de muerte celular por TNFR II (451, 452).

El TNF α es una citoquina esencial en los procesos inflamatorios, induce cambios proinflamatorios en células endoteliales, incluyendo producción de citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, liberación de sustancias procoagulantes e inducción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (453). En macrófagos, regula la expresión de MHC I, e induce la producción de IL1, y quimioquinas (454). Sin embargo, también tiene propiedades anti-inflamatorias ya que inhibe la producción de IL12, una de las principales citoquinas pro-inflamatorias secretada por macrófagos. El balance entre IL12 y TNF α es clave en los procesos homeostáticos que regulan las respuestas inflamatorias, particularmente en enfermedades crónicas (407). Además de sus cualidades pro y anti-inflamatorias, el TNF α participa en el desarrollo de los linfocitos T al inducir la apoptosis de los timocitos autorreactivos durante el proceso de selección negativa, y regula la expansión de linfocitos T maduros periféricos (455). Así mismo, induce la proliferación de células T naïve, e incrementa la expresión del receptor de IL2 y la expresión de MHC II en linfocitos activados (454, 407).

Al igual que la IL10, el TNF α se ha asociado al desarrollo de procesos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide, artritis psoriásica y enfermedad inflamatoria intestinal, y a la aparición de síndromes inflamatorios asociados a terapias con IL2 en tumores sólidos y ac. mo. anti-CD3 en rechazo de trasplantes. La inhibición de la actividad proinflamatoria del TNF α se basa en la administración de agentes anti-TNF que actúan en diferentes puntos de su producción: inhibidores de fosfodiesterasas (síntesis), TNF metaloproteasas (procesamiento), TNFR soluble y anticuerpos monoclonales anti-TNF α o anti-TNFR (proteína liberada). La inmunoterapia con ac. mo. es novedosa y ha aportado resultados relativamente exitosos en protocolos clínicos de sepsis, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn (453, 454, 456, 457).

Por otro lado, estudios realizados en modelos animales revelan propiedades anti-inflamatorias del TNF α en diferentes procesos patológicos. En modelos animales Knock-out, tanto para la citoquina como para su receptor, de EAE, isquemia cerebral, epilepsia, o infecciones parasitarias fallan en la resolución del proceso patológico y sus síntomas son peores, evidenciando una función homeostática esencial en la limitación de la extensión y duración del proceso inflamatorio *in vivo* (407).

➤ El **sistema del interferón humano (IFN)**: la familia de los interferones agrupa una serie de citoquinas con actividad antiviral secretadas por las células en respuesta a diferentes estímulos, potencian la respuesta Th1 y fueron las primeras citoquinas usadas terapéuticamente. Se agrupan en dos grandes categorías en función de su secuencia de proteínas, población productora y uso de receptores: *interferones tipo I* que incluye IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω , e *interferones tipo II* que únicamente incluye el IFN γ (440).

Dentro de la subfamilia de los **interferones tipo I**, el IFN α y el IFN β son los miembros más importantes, su expresión se induce en las células por exposición a virus de doble cadena de ARN. El receptor se compone de dos cadenas, IFN- α R1 e IFN- α R2, que señalizan a través de la vía de las MAPK y Jak-Stat. Tienen actividad antiviral y antiproliferativa, y estimulan la capacidad citotóxica en linfocitos T, células NK, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Potencian la eliminación de células tumorales y células infectadas por virus, incrementando la expresión en superficie de antígenos tumorales y MHC I, modulando la diferenciación y la actividad proangiogénica, e induciendo la expresión de genes y proteínas proapoptóticos al tiempo que suprimen genes anti-apoptóticos. El IFN α engloba a una familia de 12 miembros con diferente patrón de antiviral, antiproliferativo y citotóxico sobre células NK y linfocitos T, la producción recombinante de tres variantes alélicas de uno de sus miembros (IFN α 2a, IFN α 2b e IFN α 2c) constituye la base de la terapia con interferones, aunque únicamente se ha rozado la superficie de su potencial terapéutico (440).

El IFN γ es el único miembro de la subfamilia del interferon tipo II y es producido exclusivamente por células del sistema inmune, principalmente linfocitos T y células NK, tras estimulación con antígenos específicos, mitógenos o proteínas virales. Se une a un receptor exclusivo, IFN- γ R, compuesto por dos subunidades, una cadena α (IFN- γ R1 o IFN- γ R α) y una cadena β (IFN- γ R2 o IFN- γ R β) que forman un heterotetrámero (2 α +2 β) y que señalizan a través de JAK1/JAK2 y STAT1 induciendo la activación de genes que contienen la secuencia de

activación gamma (GAS). El IFN- γ R α se expresa de forma constitutiva en prácticamente todas las células nucleadas mientras que el IFN- γ R β es inducible. (440, 458).

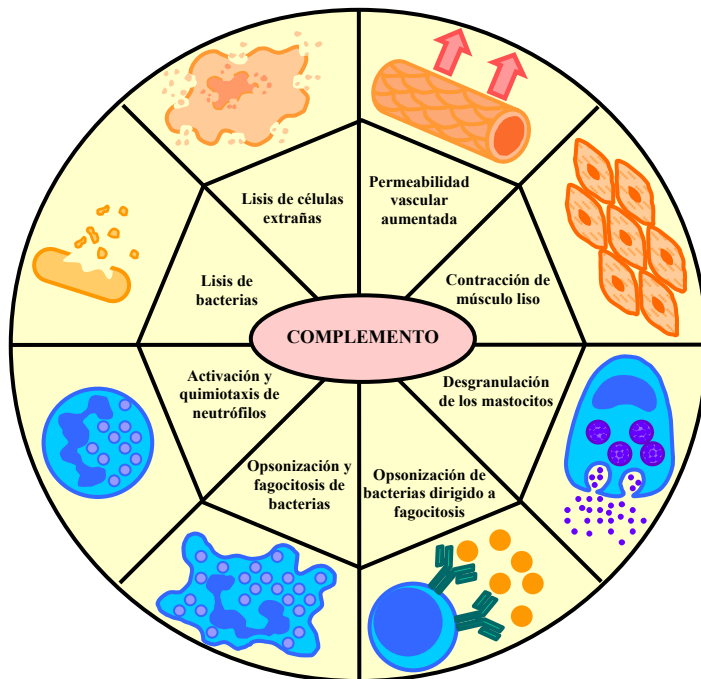
El IFN γ es esencial para la activación de la capacidad bactericida de los macrófagos, estimula la producción de IL1 y TNF α e induce la expresión de moléculas de MHC I y MHC II. Los macrófagos, a su vez, liberan IL12 tras su activación, una citoquina que estimula la liberación de IFN γ y la polarización a Th1 de los linfocitos T, y que parece ejercer una estricta regulación de las respuestas mediadas por IFN γ de ambas poblaciones durante la infección intracelular (459, 460, 401). Además de los efectos antivirales directos, el IFN γ tiene un importante papel en la regulación de los procesos inflamatorios y más ampliamente en la respuesta inmune. Regula la extravasación leucocitaria induciendo la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas en leucocitos y células endoteliales, y estimula la producción de NO por la oxido nítrico sintasa 2 (NOS2) en macrófagos (458, 461). Así mismo, promueve la diferenciación de linfocitos B a célula plasmática productora de IgG, facilita la eliminación de patógenos por monocitos y neutrófilos y estimula la expresión de receptores Fc en células NK y monocitos/macrófagos, y de proteínas del complemento por monocitos (461).

La capacidad propia del IFN γ para inducir la expresión de MHC no está restringida a células inmunes sino que se extiende a muchos tejidos no linfoides, y por lo tanto su regulación es un punto clave en el rechazo frente a transplantes. Estudios en modelos animales muestran una mayor supervivencia del injerto y una inhibición de la proliferación de linfocitos T citotóxicos implicados en la respuesta alogénica (461). Por otro lado, la actividad antiviral del IFN γ parece tener especial importancia en la defensa frente a infecciones virales del SNC, ya que las neuronas, no son células renovables y por lo tanto es necesario un mecanismo de eliminación del virus no citolítico. El IFN γ elimina la respuesta antiviral innata en las neuronas y activa la degradación del virus mediada por radicales de NO induciendo la producción de NOS-1 (458).

2.4.2. Complemento

El sistema del complemento agrupa un gran número de proteínas plasmáticas que reaccionan en cascada e interaccionan con anticuerpos unidos a antígeno y receptores de superficie colaborando en la eliminación de agentes patógenos. Algunos componentes del complemento tienen actividad quimiotáctica y provocan respuesta inflamatoria local que favorece el reclutamiento y recirculación de APCs y contribuye al inicio de la respuesta inmune adaptativa. Los componentes finales de la cascada del complemento forman poros en la membrana del agente patógeno originando su lisis directa (462).

Figura 2.4.2. Principales efectos de la activación del complemento



Existen tres vías de activación del complemento: la *vía clásica*, inducida por complejos antígeno:anticuerpo, la *vía de lectina de unión a manano (MB-Lectina)*, un constituyente normal del suero que se une a algunas bacterias encapsuladas, y la *vía alternativa* que se activa directamente sobre la superficie de los agentes patógenos (462).

3. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

La **Pancreatitis aguda (PA)** es una enfermedad inflamatoria de fase aguda que cursa con brotes inflamatorios de intensidad variable dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Son bien conocidos los eventos críticos del desarrollo del brote desde el punto de vista clínico y actualmente hay gran cantidad de información respecto a la alteración de diversos *marcadores predictivos* relacionados principalmente con *enzimas* y *precursores enzimáticos* de la cascada de eventos desencadenantes de la patología (tripsina, tripsinógeno, TAP, CAPAP...) y *metabolitos* indicadores de daño pancreático y/o hepático (lipasa, amilasa, urea...). Sin embargo y dado el carácter inflamatorio de la enfermedad en las últimas décadas la implicación del sistema inmune como regulador de la inflamación ha cobrado mayor relevancia. La implicación clínico-fisiológica de mediadores inflamatorios en el inicio, desarrollo, y control de la enfermedad, es un punto clave en el descubrimiento de nuevos y precisos marcadores predictivos, y en el tratamiento posterior con el fin de paliar el daño de tejido pancreático irreversible y de tejidos peripancreáticos ocasionado por una activación y regulación anómala de componentes del sistema inmune.

3.1. Durante el episodio de PA se producen alteraciones en el número de células, distribución y activación de las poblaciones leucocitarias, en sangre periférica y tejidos, relacionadas con la patogénesis y gravedad de la enfermedad

La *pancreatitis aguda* es una enfermedad inflamatoria caracterizada por una marcada leucocitosis, debida principalmente a un aumento de monocitos y granulocitos circulantes, y una drástica linfopenia. La alteración en la distribución de las poblaciones leucocitarias es más acusada en los pacientes con pronóstico grave, especialmente en aquellos que presentan necrosis infectada, y la remisión del brote inflamatorio conlleva la normalización de estos parámetros inmunológicos (463, 464, 465). Los modelos experimentales murinos también corroboran la implicación de las diferentes poblaciones leucocitarias en el desarrollo de la PA, en ratas se observa un incremento de monocitos y neutrófilos en fases tempranas tras la inducción de PA (466), y en ratones *nude* (incapacidad genética de generar linfocitos T) con PA las lesiones histológicas y niveles de hidrolasa en suero son menores restaurándose parcialmente la gravedad de la enfermedad tras la transferencia de linfocitos T (467).

Numerosos estudios, tanto en pacientes como en modelos experimentales, han demostrado la relación entre la alteración de parámetros inmunológicos, como la distribución

de las poblaciones linfocitarias y la expresión de marcadores de activación/inflamación por linfocitos y monocitos, y la progresión y gravedad de la pancreatitis aguda.

3.1.1. Disminución de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes y modelos experimentales murinos, mayor relación de la subpoblación CD4+ con la gravedad de la PA.

El número de linfocitos CD4+ y CD8+ circulantes disminuye en pacientes con PA dentro de las primeras 24-48h de iniciado el brote respecto a controles sanos, aunque no respecto a pacientes con abdomen agudo no pancreático, y los niveles no se normalizan hasta un mes después (465, 468, 469). La mayor implicación de una subpoblación respecto a la otra en la progresión hacia la forma grave de la enfermedad no esta muy clara, los primeros estudios revelaron una disminución de linfocitos CD4+ pero no de CD8+ en pacientes graves respecto a leves (463) y una correlación inversa entre los niveles de CRP, un marcador pronóstico, y el porcentaje de CD4+. Además, en pacientes que sufrieron ataques posteriores a un episodio agudo de PA, se observó un incremento de linfocitos CD4+ respecto a la fase aguda (468). Sin embargo, estudios más recientes muestran una mayor implicación de la subpoblación CD8+ en pacientes graves con necrosis infectada (464) y una reducción de ambas subpoblaciones en función de la gravedad de la enfermedad (469). Por el contrario, en un modelo experimental murino se observa un incremento de linfocitos CD4+ y CD8+ circulantes poco tiempo después de la inducción de la PA que desciende con la remisión del episodio agudo (466), mientras que en otro estudio se produce un aumento de linfocitos CD4+ infiltrados al páncreas y la gravedad de la enfermedad es menor en ratones deplecionados de linfocitos CD4+ pero no de CD8+ (467).

Aunque el marcador soluble más estudiado es el receptor de la IL2 (sIL2-R), algunos autores han medido las concentraciones séricas de CD4 y CD8 solubles (sCD4 y sCD8) encontrando niveles superiores de sCD8 e inferiores de sCD4 en pacientes con PA en fases tempranas, con concentraciones mayores de ambos marcadores en pacientes graves respecto a leves (469, 470).

3.1.2. Los linfocitos T de pacientes con PA muestran alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de activación (CD25, CD69 y HLA-DR) durante el brote inflamatorio

Además de las alteraciones observadas en el número y distribución de las poblaciones linfocitarias, un reducido número de estudios realizados en pacientes con PA muestran diferencias en los niveles de expresión de marcadores de activación en linfocitos T y B en fases tempranas de la enfermedad. Los linfocitos de tejido y sangre periférica de pacientes con PA muestran un incremento de los marcadores activación tempranos, CD25 y CD69, y una disminución de HLA-DR, un marcador de activación tardío (471). La expresión de CD69 aumenta a las 48h de iniciado el brote en linfocitos T CD4+ y a la semana en linfocitos T CD8+ respecto a controles sanos, pero no se observan diferencias en el nº de linfocitos CD4+CD69+ y CD8+CD69+ respecto a controles patológicos ni entre pacientes leves y graves. Sin embargo, el nº de linfocitos B CD19+CD69+ es menor en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL en el 3º día de evolución del brote (472, 465). Por otro lado, el nº de linfocitos T CD3+HLA-DR+ circulantes en pacientes es normal al 5º día de evolución pero aumenta un mes después. Las diferencias en función de la gravedad, sin embargo, no se asocian a esta subpoblación sino a los linfocitos CD3+HLA-DR- cuyo número es menor en pacientes graves respecto a leves (463).

La presencia de linfocitos CD4+HLA-DR+ y CD8+HLA-DR+ en sangre periférica y CD4+HLA-DR+ en torno al conducto pancreático junto con la detección de autoanticuerpos, se ha relacionado con el desarrollo de pancreatitis asociada a hipergammaglobulinemia, una pancreatitis de carácter autoinmune más propia de procesos recurrentes o crónicos que de procesos agudos. La producción de IFN- γ por los linfocitos CD4+ circulantes pero no de IL4 esta relacionada con una respuesta inmune tipo Th1 característica de las enfermedades autoinmunes (20, 21, 22).

3.1.3. Los monocitos de pacientes con PA muestran una disminución en los niveles de expresión de HLA-DR, con diferencias en función de la gravedad de la enfermedad y el desarrollo de complicaciones

Dentro del conocimiento global sobre la implicación de los componentes del sistema inmune en la patogénesis de la PA, los monocitos constituyen una de las poblaciones más estudiadas por su participación directa en los procesos inflamatorios responsables del daño

pancreático y orgánico mediante la producción de citoquinas y la activación de linfocitos T. La expresión de HLA-DR (MHC II), una molécula imprescindible en la activación del linfocito T a través del TCR, es un indicador muy fiable del grado de activación y funcionalidad del monocito.

Los monocitos de pacientes con PA muestran una disminución de la expresión de HLA-DR al inicio del brote inflamatorio, independientemente de la gravedad de la enfermedad, sin embargo, los niveles de expresión son menores en pacientes graves respecto a leves y dentro de este grupo son más bajos en pacientes que desarrollan fallo orgánico o sepsis respecto a los que no lo padecen (473, 474, 475). Así mismo, los monocitos de pacientes con PAL recuperan niveles normales de expresión de HLA-DR al tercer día de evolución del brote, mientras que en pacientes con PAG permanecen por debajo de los valores control (476). Aunque se observan diferencias relacionadas con el índice de supervivencia en los pacientes con PAG, parece que, una vez producido el fallo orgánico, los niveles de expresión de HLA-DR no difieren entre supervivientes y fallecidos (476, 42). El tratamiento quirúrgico en estos pacientes no modifica los niveles de expresión y las operaciones posteriores no alteran los valores obtenidos en la primera intervención (473).

La disminución de los niveles de expresión de HLA-DR en monocitos tiene valor predictivo, con un alto índice de sensibilidad y especificidad, en el desarrollo de complicaciones sépticas, mala progresión y fallo multiorgánico. Existe una correlación inversa entre los niveles de expresión y varios marcadores predictivos de gravedad como el índice APACHE II y MODS (fallo multiorgánico), la CPR y diversas citoquinas (IL6, IL1RA e IL10), además el pico máximo de CPR, un indicador de reacción inflamatoria sistémica, coincide con la mínima expresión de este marcador (477, 478, 475, 42).

3.1.4. Incremento de los niveles de expresión de CD11b en monocitos y neutrófilos, y de su ligando ICAM-1 en páncreas y pulmón, durante el brote de PA. Reducción de la gravedad de la enfermedad y del daño sistémico mediante terapia con anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1.

La activación intrapancreática de enzimas digestivas provoca daño tisular y la liberación de mediadores inflamatorios que reclutan monocitos, macrófagos y neutrófilos al foco de lesión, estos a su vez producen citoquinas y quimioquinas que reclutan linfocitos. La activación mutua de linfocitos T y monocitos provoca la liberación de más citoquinas y

quimioquinas que reclutan nuevos monocitos, neutrófilos y linfocitos; la retroalimentación de esta cadena de eventos es la responsable de la inflamación y necrosis de la glándula, y de la recirculación de componentes celulares activados a otros órganos con el consiguiente daño tisular y posterior fallo orgánico. El proceso de activación y adherencia de leucocitos implica la regulación positiva de moléculas de adhesión endoteliales (ICAM-1 y VCAM-1) y leucocitarias (CD11b y CD62L), la alteración en los niveles de expresión de estas moléculas se asocia con el grado de daño pancreático y posteriores complicaciones como el ARDS.

Estudios realizados en modelos animales han revelado un incremento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en páncreas, y de CD11b en monocitos, tras la inducción de la PA, siendo la aparición de ICAM-1 en páncreas más temprana, y observándose presencia en pulmón, cuando se induce una PA grave (479, 480, 466, 481). El aumento de la expresión de ICAM-1 por células endoteliales, así como de la forma soluble, parece estar relacionado con la presencia de tripsina en los tejidos, estos cambios potencian la interacción leucocito-endotelio y contribuyen a la migración leucocitaria (482). El bloqueo de CD11b con ac. mo. reduce significativamente la infiltración de leucocitos en el páncreas y aumenta el número de células polimorfonucleares en sangre periférica en un modelo experimental de PA en ratas (482). Efectos similares se observan con el tratamiento con anticuerpos anti-ICAM-1 y anti-VCAM-1, reducción de las lesiones histológicas, la infiltración leucocitaria y la actividad mieloperoxidasa (MPO)(479, 481); sin embargo, en ratones deficientes en ICAM-1 no se eliminan por completo los daños locales y sistémicos y, aunque la depleción de neutrófilos si tiene efectos beneficiosos, la combinación de ambos factores no reduce la gravedad de la PA (480).

En pacientes con PA se observa un incremento de los niveles de expresión de CD11b en monocitos y neutrófilos, siendo los niveles superiores y manteniéndose elevados durante el brote, en pacientes con fallo orgánico (fallo respiratorio) respecto a los que no lo desarrollan (474, 484). Sin embargo, la expresión de CD62L, otra molécula de adhesión leucocitaria implicada en la fase de contacto y adhesión, no guarda relación con la gravedad de la enfermedad (474). Por otro lado, un estudio realizado en pacientes sometidos a ERCP que sufrieron posteriormente un ataque de PA, reveló una correlación positiva entre los niveles de amilasa y los niveles de expresión de CD11b con un índice de correlación mayor tras la intervención (485). Los mediadores pro-inflamatorios, muchos de ellos liberados como

consecuencia del daño tisular durante la PA (PAF, IL8, complemento), inducen la expresión de CD11b, el uso experimental de anticuerpos anti-ICAM-1, ligando de CD11b, reduce significativamente los desórdenes microcirculatorios y el daño sistémico asociado (486, 487). También se han observado correlaciones entre los niveles TNF α , otro mediador pro-inflamatorio, y moléculas de adhesión solubles (ICAM-1 y VCAM-1) en pacientes con PA (488).

3.2. Implicación de las quimioquinas y quimiorreceptores en la infiltración de leucocitos en el páncreas y órganos periféricos durante el episodio de PA, y su posible relación con la gravedad de la enfermedad

Los estudios realizados en diversas enfermedades han revelado la participación de una amplia variedad de quimioquinas y quimiorreceptores en el reclutamiento, recirculación y activación de diferentes tipos celulares implicados en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad. Los quimiorreceptores CCR5 y CXCR4 son usados por el HIV como correceptores de entrada a linfocitos T CD4+ y monocitos, las quimiocinas MCP-1, MCP-4 y eotaxina inducen la liberación de histamina y reclutan eosinófilos en las enfermedades alérgicas (asma, dermatitis atópica, rinitis), mientras que IP-10, RANTES, MIP-1 α e IL-8 y MCP-1 controlan la infiltración de linfocitos, macrófagos y neutrófilos en articulaciones, mucosa intestinal, dermis y SNC en enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, o la psoriasis. Con excepción del HIV no hay una relación directa entre una patología y la expresión de un quimiorreceptor pero, CCR2, CCR5 y CXCR3 se asocian con lesiones inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, la enfermedad Crohn o la esclerosis múltiple, CXCR1 y CXCR2 con inflamación aguda, y CCR3 se expresa mayoritariamente en patologías alérgicas (239, 240, 241, 489).

Dentro del marco de las enfermedades inflamatorias las quimioquinas y quimiorreceptores son un punto clave en la patogénesis de la enfermedad, ya que los componentes del sistema inmune extravasados a los focos de inflamación son los responsables del daño del tejido y de los efectos colaterales a otros órganos. En los últimos años varios estudios han demostrado la implicación de diversas quimioquinas y quimiorreceptores en los mecanismos inflamatorios locales y sistémicos desencadenados durante el episodio de fase aguda de la PA.

3.2.1. Durante el episodio de PA aumentan los niveles de quimioquinas en sangre, líquido ascítico y tejidos. El incremento es mayor en pacientes con PAG y para ciertas quimioquinas (MCP-1, IL8, GRO α y ENA-78) tiene valor predictivo en el desarrollo de complicaciones y fallo orgánico

El incremento de quimioquinas con capacidad quimiotáctica para monocitos y neutrófilos (MCP-1, CINC, MIP, Mig, IL8, ENA-78), en páncreas, plasma y líquido ascítico, se asocia con el daño local y sistémico durante la PA y los niveles varían en función de la gravedad de la enfermedad. En diversos modelos experimentales se ha detectado un aumento de los niveles de ARNm y proteína de MCP-1 y CINC, y de MIP-2, en células acinares pancreáticas, plasma y suero en fases tempranas tras la inducción de la PA (490-493). Los neutrófilos infiltrados expresan principalmente MCP-1 y los macrófagos CINC (492). Así mismo, las células acinares cultivadas *in vitro* producen MCP-1 y RANTES, y la presencia de colecistoquinina y etanol, dos inductores clásicos de PA moderada y grave respectivamente, tiene efectos contrarios sobre los niveles de producción: la primera incrementa los niveles MCP-1 y disminuye los de RANTES mientras que el segundo incrementa los niveles de RANTES e inhibe la producción de MCP-1 (494, 495). Por el contrario, quimioquinas inhibitoras de la migración de macrófagos como el MIF se encuentran principalmente en suero, líquido ascítico y pulmón pero no en páncreas tras la inducción de PA, y el aumento de los niveles en suero y líquido es mayor en la PAG (496).

La administración profiláctica y terapéutica de anticuerpos monoclonales anti-quimioquinas y antagonistas de receptores de quimioquinas, en modelos experimentales, tiene efectos diversos en el control del daño local y sistémico dependiendo de la quimioquina neutralizada. Los anticuerpos monoclonales anti-CINC y Met-RANTES, antagonista del receptor de RANTES, tienen poco efecto en el daño pancreático pero reducen el daño pulmonar y pueden suponer una futura terapia para las complicaciones de la PA como el ARDS (497, 498); los anticuerpos anti-MIF mejoran la supervivencia de ratas y ratones con PAG (496), mientras que los anticuerpos anti-IL8 incrementan los niveles de MCP-1 e indirectamente el daño pancreático (491).

Los escasos estudios realizados en pacientes con PA aportan resultados muy similares a los obtenidos en modelos experimentales, se observa un incremento de MCP-1, RANTES, IL8, GRO α , ENA-78 y MIF en suero de estos pacientes. Los niveles de MCP-1 y MIF son mayores en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL, la concentración de MCP-1 es

mayor en fluido aspirativo pancreático respecto a los niveles en sangre, y su elevación correlaciona con la gravedad del fallo orgánico (499, 496); mientras que las quimioquinas quimioattractantes de neutrófilos, IL8, GRO α y ENA-78, se detectan en fases muy tempranas únicamente en pacientes con PAG y tienen valor predictivo de la gravedad del brote de PA. (500). Existen interacciones entre las quimioquinas y otros mediadores pro-inflamatorios, la secreción de IL8, MCP-1 y RANTES por miofibroblastos periacinares es inducida por IL1 β y TNF α , además se observa una correlación entre la activación transcripcional de genes de quimioquinas e IL6 (501). En otras patologías relacionadas con la PA, como la pancreatitis crónica y el SIRS, también se han observado alteraciones de los niveles de estas quimioquinas en suero y tejido que se asocian la gravedad de la enfermedad (502-506).

3.2.2. La inmunorregulación de quimiorreceptores y quimioquinas podría constituir una futura terapia en la reducción del daño pancreático y la supresión de complicaciones asociadas a mal pronóstico durante la PA

Aunque se ha demostrado la implicación de los quimiorreceptores en la patogénesis de numerosas patologías inflamatorias, la expresión de estas moléculas tan importantes en el control de la recirculación leucocitaria durante el brote de PA y su posible asociación con el desarrollo de complicaciones apenas ha sido estudiada. En un modelo experimental murino la delección de CCR1, receptor de RANTES y MIP-1 α , protege contra la inflamación pulmonar secundaria a la PA aunque no impide el desarrollo de la PA en sí misma (507, 508), y en pacientes con pancreatitis crónica los macrófagos activados infiltrados en la glándula expresan CCR5 (502). Por otro lado, recientes estudios en animales han demostrado una reducción de la hiperamilasemia, la infiltración de neutrófilos (actividad MPO) y el daño pancreático tras el tratamiento profiláctico y terapéutico con un inhibidor selectivo de MCP-1 (509).

3.3. La alteración del balance de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias es uno de los principales factores desencadenantes del proceso inflamatorio asociado a la PA y condiciona el desarrollo de complicaciones sistémicas que derivan en la forma grave de la enfermedad

Dentro de los mediadores inflamatorios liberados como consecuencia del daño tisular pancreático, las citoquinas constituyen la base de la hipótesis más defendida actualmente en la patogénesis de la PA y la progresión hacia la forma grave de la enfermedad. El incremento local de factores solubles condiciona la migración de neutrófilos y monocitos a la glándula

pancreática, su activación conlleva la fagocitosis y eliminación del tejido lesionado junto con la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen a la amplificación de la respuesta biológica. Este microambiente inflamatorio induce la secreción de una serie de citoquinas contrarreguladoras que inhiben la capacidad efectora de las células fagocitarias, limitando la respuesta inflamatoria. Así pues, el balance de las interacciones entre los mecanismos pro y anti-inflamatorios condiciona la magnitud del proceso inflamatorio asociado a la PA, cuando prevalecen los mecanismos pro-inflamatorios pueden desarrollarse serias lesiones locales y sistémicas que constituyen la expresión patológica de la PAG. Una adecuada respuesta biológica propiciaría la aparición de lesiones tisulares pancreáticas limitadas y transitorias con escasa repercusión sistémica propias de la PAL (510).

3.3.1. La fase inicial de la PA se caracteriza por un aumento de citoquinas séricas y tisulares, el incremento de los niveles se asocia con el desarrollo de complicaciones locales y sistémicas, y tiene valor predictivo de gravedad diagnóstico y pronóstico

Estudios realizados en modelos animales y pacientes con PA han revelado un incremento de las concentraciones séricas y tisulares, así como de la producción por monocitos y linfocitos, tanto de citoquinas pro-inflamatorias como contrarreguladoras o anti-inflamatorias que se relaciona con la gravedad del cuadro clínico.

Los estudios en diversos modelos experimentales muestran un aumento de citoquinas pro-inflamatorias (IL1 α , IL1 β , TNF α , IL6,) y anti-inflamatorias (TGF β 1, IL10 e IL1RA) en células acinares en fases tempranas tras la inducción de la PA (511-514). Así mismo, el cultivo *in vitro* de células acinares con inductores de inflamación como el LPS y PAAF (líquido ascítico asociado a pancreatitis), aumenta los niveles de ARNm de TNF α , IL1 β e IL8 e induce la producción de TNF α respectivamente (515, 516). Además de las células acinares, los leucocitos circulantes e infiltrados en tejido también contribuyen a la producción temprana de citoquinas, los monocitos y linfocitos de sangre periférica aumentan la producción TNF α e IL10 respectivamente mientras que los leucocitos infiltrados en la glándula incrementan la expresión de IL1 β , TNF α , IL6, TGF β 1 e IL10 (466, 512, 513). La producción de TNF α es más temprana en celulares acinares respecto a monocitos y esta relacionada con el grado de stress oxidativo (517). Respecto a la asociación de citoquinas pro-inflamatorias con la progresión hacia la forma grave de la PA, se ha observado un incremento de los niveles séricos de IL8, IL β y TNF α , con correlación entre los niveles de IL8 y TNF α y la gravedad de la enfermedad,

en un modelo experimental de PAG en conejos (491). Igualmente se observa un aumento de citoquinas en lavado peritoneal de ratas con PA en fases muy tempranas, pero mientras que los niveles se reducen en ratas con PAL durante el episodio inflamatorio, en ratas con PAG se mantiene elevados (518).

No obstante, y pese a los resultados obtenidos en los diferentes modelos animales sobre la implicación de las citoquinas pro-inflamatorias en el daño pancreático, la inducción de PA en ratas knock-out para IL6, TNF α e IL1 β produce mayor daño oxidativo y nitrosativo en tejido respecto a la cepa salvaje (519). Estudios recientes en modelos animales muestran niveles plasmáticos de TNF α inferiores en ratas con PAG respecto a ratas sanas debido a la inactivación y degradación de la proteína por proteasas pancreáticas (520). Estos datos demuestran que el control de la respuesta inflamatoria en la PA reside en la restauración del balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias y no en la supresión de los mediadores pro-inflamatorios.

La IL2 no puede ser clasificada como mediador pro o anti-inflamatorio pero es una citoquina imprescindible en la activación de linfocitos y monocitos, induce la proliferación y secreción de otras citoquinas, y promueve la apoptosis; por lo tanto, es un factor regulador en los procesos inflamatorios. En un modelo experimental murino se observa una reducción de la producción de IL2 por linfocitos CD4⁺ en fases tempranas tras la inducción de la PA, la administración intraperitoneal de LPS se asocia a una reducción de IL2 y un aumento de la mortalidad mientras que la terapia *in vivo* con IL2 recombinante mejora la secreción endógena de esta citoquina y reduce la mortalidad inducida por el LPS (521).

En pacientes con PA existe un conocimiento exhaustivo de las alteraciones en los niveles de citoquinas, su relación con la gravedad del episodio inflamatorio, y el valor predictivo diagnóstico y pronóstico. Los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL6, IL8 y sIL2R) son mayores en pacientes que desarrollan complicaciones sistémicas (sepsis, necrosis infectada, SIRS, fallo orgánico múltiple o ARDS) respecto de aquellos que padecen la forma leve de la enfermedad, y se mantienen elevados durante la evolución del brote inflamatorio (68, 488, 484, 522-526). La secreción de estas citoquinas por monocitos también se asocia con la aparición de complicaciones (527). El aumento de los niveles de IL6 en pacientes con PA es independiente de la gravedad del ataque, sin embargo únicamente los pacientes graves muestran diferencias en los niveles de IL8 y TNF α respecto a controles sanos

(528). La implicación de otra importante citoquina pro-inflamatoria, la IL1 β , en la progresión hacia la forma grave de la enfermedad esta sujeta a controversia, algunos autores informan de un aumento en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL mientras que otros no observan diferencias entre ambos grupos (522, 527). Los niveles de citoquinas anti-inflamatorias también varían en función de la gravedad de la enfermedad, observándose concentraciones plasmáticas/séricas elevadas de IL10, IL1RA, sTNFR1 y sTNFR2 en pacientes con PAG y fallo orgánico, especialmente en aquellos que fallecen respecto a los que sobreviven, así como alteraciones en el balance de citoquinas pro y anti-inflamatorias (IL10/IL6, IL10/IL8, IL1RA/IL1 β , y TNFR/TNF α) asociado a la aparición de complicaciones y empeoramiento del cuadro clínico (41, 523-526, 529).

La PA post-ERCP es uno de los efectos colaterales más frecuentes asociados al tratamiento quirúrgico de la propia PA, el conocimiento pronóstico, control y prevención de este nuevo episodio es crítico en la remisión completa y buen término de la enfermedad. A las pocas horas de la ERCP se detectan secuencialmente niveles de IL1RA, IL6, IL8 y en último término el receptor soluble de TNF (sTNFR2) a las 24h; respecto a la IL1 β y TNF α algunos autores informan de un incremento de los niveles a las 8h y 24h mientras que otros no observan cambios. La activación linfocitaria, puesta de manifiesto por el incremento de los niveles de sIL2R, tiene lugar días después del trauma inicial (530-533). Los valores máximos de IL6 e IL10 correlacionan con el índice de dolor, el grado de irritación ampular y la duración de la intervención, también se ha observado correlación entre la IL6 y la CPR (530, 532).

El incremento de los niveles séricos de citoquinas tanto pro-inflamatorias (IL6, IL1 β , IL8, TNF α , sIL2R) como anti-inflamatorias (IL1RA, IL10, sTNFR1 y sTNFR2) tiene valor predictivo de gravedad diagnóstico y pronóstico. La especificidad y sensibilidad varían en función de la citoquina y el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas, siendo los niveles de IL6 en las primeras 24h los que presentan el mayor índice de especificidad y sensibilidad. El uso combinado de estos marcadores con otros marcadores predictivos como la amilasa, lipasa, CPR o índice APACHE II aumenta la fiabilidad en la discriminación precoz entre PAL y PAG (42, 522, 524, 525, 533, 534). El uso combinado de los niveles de IL10 plasmática y Ca²⁺ sérico dentro de las primeras 12h tras la admisión hospitalaria tiene mayor valor predictivo de fallo orgánico respecto al uso individual de otros marcadores (43). La formación de inmunocomplejos de autoanticuerpos anti-IL8:IL8 también puede actuar como factor

pronóstico específico del desarrollo de ARDS, una de las complicaciones más graves en la PAG, ya que la concentración en lavado broncoalveolar de pacientes con riesgo de fallo respiratorio y altos niveles de IL8 es mayor en aquellos que desarrollan esta complicación respecto de los que no (535).

Los leucocitos activados son uno de los principales productores de citoquinas, y su infiltración en el páncreas y órganos periféricos se asocia a la fase de respuesta sistémica en la progresión de la PA. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ y los monocitos procedentes de tejido necrótico de pacientes con PA alcohólica y PA biliar muestran un patrón variable en la expresión de citoquinas intracelulares en respuesta a mitógenos que no sigue una típica polarización Th1/Th2, lo que sugiere una posible capacidad de modificación en respuesta a condiciones locales (536, 471). Por otro lado, los linfocitos de pacientes con PA incrementan la producción de IL2 pero no de IL10 en cultivo *in vitro* con enterotoxina de estafilococos (472).

3.3.2. La inmodulación en modelos experimentales tiene efectos beneficiosos en la reducción del daño local y sistémico, y constituye la base de futuras terapias en la prevención y tratamiento de la PA

Actualmente se estudian los efectos terapéuticos de varias citoquinas y análogos de citoquinas anti-inflamatorias, así como de anticuerpos monoclonales contra citoquinas pro-inflamatorias, en la regulación de la respuesta inflamatoria con el fin de reducir el daño pancreático y sistémico. La efectividad de estos antagonistas depende no solo de su habilidad para bloquear los efectos de los mediadores inflamatorios sino de una administración temprana en la evolución de la PA antes de la necrosis pancreática y la disfunción orgánica (537).

En diversos modelos experimentales animales, la administración de IL10 así como la terapia génica con IL10 humana reduce los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias (IL1 β , IL6, TNF α), los niveles de amilasa, el daño pancreático y aumenta la supervivencia (538, 539). Efectos similares sobre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias se han observado tras la inyección de IT9302, un análogo de IL10, o anticuerpos monoclonales anti-IL8 (491). Por otra parte, el bloqueo de la actividad de TNF α con anticuerpos monoclonales anti-TNF α disminuye significativamente los niveles de amilasa, el índice histopatológico, la infiltración de neutrófilos y la actividad MPO en un modelo experimental de PA en ratas (540). Sin embargo,

la extravasación de neutrófilos es esencial para el control de las infecciones pancreáticas y peripancreáticas asociadas a la PA, y por lo tanto la terapia más adecuada es aquella que restaura y mantiene el balance de citoquinas. En un modelo experimental de PAG en ratas, la administración profiláctica de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) aumenta la infiltración de neutrófilos bactericidas y fagocitos pero no induce respuesta inflamatoria sistémica mediada por citoquinas proinflamatorias ni provoca extravasación de líquido ascítico (541).

En contraste con los efectos beneficiosos de la modulación de citoquinas en modelos experimentales, su extrapolación directa en estudios clínicos ha proporcionado resultados contradictorios o poco exitosos (447). La IL10 es una de las citoquinas más estudiadas como candidato a la inmunomodulación, aunque en algunos protocolos clínicos no se observó una reducción significativa de la incidencia o la gravedad de la PA inducida por ERCP, la administración de IL10 recombinante parece ser efectiva como tratamiento profiláctico en la prevención de la PA post-ERCP. No obstante, el coste de la aplicación terapéutica de rutina podría ser un factor limitante (542, 44).

3.4. La apoptosis en la PA contribuye a la eliminación del tejido pancreático dañado sin generar efectos inflamatorios

Tanto la necrosis como la apoptosis son mecanismos de eliminación celular mediante fagocitosis por macrófagos, pero mientras que las células apoptóticas son fagocitadas intactas sin afectar a las células vecinas, las células necróticas se fragmentan generando efectos colaterales e inflamación. La apoptosis de células acinares durante el brote de PA limita los daños tisulares, la activación leucocitaria y el desarrollo de complicaciones sistémicas.

La PAL se asocia a un predominio de los mecanismos apoptóticos en el páncreas por oposición al predominio de la necrosis en la PAG (543). En ratones deficientes en Fas (CD95), un receptor que induce la apoptosis de la célula, aumentan los niveles de amilasa y el daño histológico (edema, inflamación, vacuolización y necrosis) respecto a la cepa salvaje tras la inducción de PA (544). Por otro lado, en ratas con PAG combinada con isquemia/reperfusión del páncreas, se observa un aumento de la apoptosis en páncreas y una disminución en pulmón, durante la evolución del brote, que se corresponden con otros marcadores de gravedad como la sobreproducción de NO y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (514). Otros estudios realizados en modelos experimentales muestran una reducción de la gravedad de la

PA cuando se administra profilácticamente un inductor de apoptosis, mientras que la disminución de la sensibilidad a estímulos apoptóticos, provocada por alteraciones en la conexión entre células acinares, convierte la PAL en PAG (545, 546).

Los mecanismos apoptóticos no están restringidos a la glándula pancreática, actualmente se postula que las manifestaciones sistémicas asociadas a la PA, de las cuales la más importante es el fallo multiorgánico, se deben en parte al aumento de la muerte celular por apoptosis en los órganos implicados (pulmón, riñón, hígado, tubo digestivo) (547). El daño hepático, uno de los indicadores pronósticos de gravedad en PA, se asocia a un incremento de la apoptosis mediada por Fas-L en células de Kupffer en ratones (548). Por otro lado, algunos autores postulan que la linfopenia asociada a la PAG podría deberse a un aumento de la apoptosis, lo que supondría un empeoramiento de la inmunidad celular y el desarrollo de infecciones (464, 547). En otro estudio realizado en células mononucleares de sangre periférica, se observan niveles de apoptosis menores en pacientes con PA que desarrollan complicaciones respecto a los que no las desarrollan durante la primera semana de evolución del brote; a partir del 5º y 6º día la apoptosis disminuye en pacientes sin complicaciones mientras que en pacientes con complicaciones se produce un incremento al 9º y 10º respecto al primer grupo (549).

3.5. Efectos del metabolismo del óxido nítrico en la gravedad de la PA

Los mecanismos de oxidación están muy asociados al daño al tisular, los monocitos y neutrófilos activados producen especies reactivas del oxígeno durante el proceso de fagocitosis, entre las que se encuentra el NO. Varios estudios en modelos experimentales demuestran la implicación del NO endógeno en la formación del edema pancreático mediante el incremento de la permeabilidad vascular, en las alteraciones en la microcirculación y en el daño tisular en páncreas y pulmón (550). La inhibición de la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) reduce la formación del edema pero no previene el daño histológico mientras que la ausencia o inhibición de la forma inducible (iNOS) reduce el grado de inflamación y daño tisular (551-554). Así mismo, la inducción de PAG en ratas mediante isquemia-reperfusión provoca un moderado incremento de la actividad de iNOS en páncreas y una disminución, tras un aumento inicial, en pulmón en las primeras 24 horas (514). Sin embargo, otros estudios muestran un efecto protector tanto del NO endógeno como del exógeno frente a algunas de alteraciones causadas por la PA. El NO endógeno protege contra el daño oxidativo en fracciones subcelulares disminuyendo la actividad catalasa y superóxido dismutasa, también

tiene efectos protectores sobre células no acinares, principalmente células endoteliales cuando es sintetizado por la NOS endotelial, y aumenta el flujo microvascular pancreático (555, 556). Por otro lado, la administración de nitroprusiato sódico, un donador de NO, durante la isquemia/reperfusión del páncreas protege del daño pancreático reduciendo la resistencia vascular y la infiltración (551).

En pacientes con PA, la excreción de NO en orina es mayor en aquellos que desarrollan la forma grave respecto de los pacientes con PAL y controles sanos, los niveles correlacionan estrechamente con la permeabilidad intestinal y marcadores de endotoxina pero no con la CRP ni el índice APACHE II (557). Así mismo, el RNI (forma reactiva del nitrógeno) sérico, una medida indirecta del NO, se encuentra elevado en pacientes con PAG respecto a controles sanos, siendo los niveles mayores en pacientes que desarrollan sepsis bacteriana y en los que fallecen respecto a los que sobreviven (558).

OBJETIVOS

Hipótesis

La Pancreatitis aguda es un proceso inflamatorio acompañado de fenómenos de necrosis celular a nivel de la glándula, con producción y liberación de diferentes mediadores capaces de inducir sufrimiento y daño celular a nivel local y sistémico. De hecho, además de las manifestaciones clínicas propias de la inflamación pancreática se objetivan alteraciones de órganos y tejidos periféricos. El compromiso leucocitario está bien caracterizado con evidencia de alteración en granulocitos, monocitos y linfocitos, así como en los niveles circulantes de moléculas características de la regulación y fase efectora de la respuesta inmune. Debido a los antecedentes existentes en el conocimiento médico y a la producción y liberación masiva de moléculas que pueden afectar a las células del SI, es posible establecer la hipótesis de una alteración de las diferentes poblaciones leucocitarias circulantes desde las fases precoces de la enfermedad, y cuyo patrón pueda ser variable según el daño pancreático.

Objetivos

Con base a este planteamiento decidimos investigar en pacientes con PA clasificados en relación a la intensidad de la enfermedad, pancreatitis aguda leve (PAL) y pancreatitis aguda grave (PAG), los siguientes parámetros en células del SI circulantes:

- a) En el compartimiento linfocitario T: la distribución de sus subpoblaciones, estado de activación, expresión de moléculas implicadas en la distribución tisular, capacidad de producción de citoquinas intracelulares y apoptosis.
- b) En linfocitos B y células NK: su estado de activación y la expresión de moléculas implicadas en la distribución tisular.
- c) En monocitos: su estado de activación, expresión de moléculas implicadas en la distribución tisular, capacidad de producción de citoquinas intracelulares, y funciones efectoras fagocíticas y de generación de radicales libres de óxido nítrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población objeto de estudio

1.1. Pacientes con Pancreatitis aguda

Se incluyeron en el estudio 29 pacientes con Pancreatitis guda leve y 17 pacientes con Pancreatitis aguda grave procedentes de los Servicios de Digestivo y de Cuidados Intensivos respectivamente del Hospital Universitario Príncipe de Asturias conforme a los siguientes criterios de inclusión-exclusión:

1.1.1. Criterios de inclusión y estratificación: basados en el Sistema de Clasificación de Atlanta (36) y la Guía de manejo de la Pancreatitis del Reino Unido (88)

Pancreatitis aguda: dolor abdominal + elevación ≥ 3 veces el límite superior de amilasa sérica y/o elevación ≥ 2 veces el límite superior de lipasa sérica.

Pancreatitis aguda leve: ausencia de

- a) Disfunción orgánica: presión arterial sistólica < 90 mmHg, $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg, creatinina $> 2\text{mg/dL}$, sangrado digestivo > 500 ml/24h.
- b) Complicaciones locales: necrosis, absceso, pseudoquiste.
- c) ≥ 3 criterios de Ranson (31) o ≥ 8 puntos de clasificación APACHE II (34)

Pancreatitis aguda grave: presencia al menos de uno de los siguientes criterios:

- a) disfunción orgánica
- b) complicaciones locales
- c) ≥ 3 criterios de Ranson o ≥ 8 puntos de la clasificación APACHE II

1.1.2. Criterios de exclusión:

- a) Tratamiento con fármacos inmunosupresores
- b) Enfermedades que modifiquen la respuesta inmunitaria: procesos autoinmunes, infecciones crónicas, neoplasias, diabetes mellitus.
- c) Insuficiencia orgánica previa: renal (creatinina > 2 mg/dL), respiratoria ($\text{PaO}_2 < 60$ mmHg), cardíaca (clase funcional $> \text{II}$), cirrosis hepática.
- d) Evolución clínica superior a 48 horas en el momento de la admisión hospitalaria.
- e) Presencia de complicaciones infecciosas en el momento del diagnóstico.

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado al protocolo experimental

1.2. Controles: se estudiaron paralelamente muestras procedentes de 60 voluntarios sanos de edad y sexo similares a los pacientes.

Tabla 1.: Descripción demográfica de la población objeto de estudio

Grupo		n	Edad media (rango)	Distribución por sexos (M / V)
Controles		60	47 (23-85)	35 / 25
	Etiología			
	Biliar	18	70 (59-77)	10 / 8
Pancreatitis aguda leve	Etílica	7	50 (46-64)	0 / 7
	Otras	4	60 (40-76)	3 / 1
Pacientes				
	Biliar	13	79 (72-83)	8 / 5
Pancreatitis aguda grave	Etílica	3	51 (36-)	0 / 3
	Otras	1	80	1 / 0

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para la entrada en este protocolo. M: mujer; V: varón. Los resultados representan la mediana y los percentiles (25-75).

2. Protocolo clínico

Con el objeto de determinar la evolución de los parámetros inmunológicos durante el episodio agudo se extrajo a cada paciente una muestra de sangre periférica en el momento del diagnóstico, otra a las 48 horas y una última muestra a los 5 días de diagnosticada la patología.

En todos los pacientes se efectuó la correspondiente evaluación clínica que incluyó: Hª clínica completa, hemograma, bioquímica sérica, gasometría arterial basal, amilasa, lipasa, proteína C reactiva, Rx de torax y ecografía abdominal. En aquellos casos en los que existieron datos de gravedad se practicó un TAC abdominal valorado según la clasificación de Balthazar y la presencia de necrosis pancreática (28).

3. Materiales

Tabla 3.: Reactivos, materiales y aparatos utilizados en el procesamiento de las muestras agrupados por técnicas de laboratorio

TÉCNICA	Materiales			
Extracción muestras	Tubos 10 ml con heparina de litio “venoject”		Terumo Corp. (Leuven, Bélgica)r	
	Set para recolección de sangre “Vacutainer System”		Becton-Dickinson Labware (Meilan Cedex, Francia y NJ, USA)	
Separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	<i>Reactivos</i>		<i>Materiales y aparataje</i>	
	Suero salino fisiológico	Fresenius Kabi, (Barcelona, España)	Tubos de 50 ml polipropileno	Labcenter SL (Madrid, España)
	Ficoll “lymphoprep”	Axis-Shield Poc AS. (Oslo, Noruega)	Pipetas estériles graduadas 10 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Alemania)
	Azul tripan	Flucke AG., Buchs (SG., Alemania)	Puntas de propileno virgen 200 µl y 1 ml	Daslab (Madrid, España)
	<u>Medio de cultivo</u>		Cámara de flujo laminar vertical Gelaire TC 48	Flows labs. (Alemania)
	RPMI 1640 con L-glutamina	BioWhittaker (Verviers, Bélgica)	Cámara de contaje Neubauer	Saaringia (Alemania)
	Hepes Buffer (25mM)		Microscopio Olympus CHS-2	Olympus (Tokyo, Japón)
	Mecla antibiótica: Streptomycin-Penicilina (10 mg/ml)	Biowhitaker Tamadit Lab., Dr. Esteve SA. (Madrid, España)	Bomba de aire para pipeteo, “Pipetus”	Flow Lab. (Alemania)
	Gentamicina (1.6 mg/ml)	Squibb, Esplugues, (Barcelona, España)	Pipetas de volumen ajustables Pipetman p20, 200, 1000	Gilson (Francia)
	Anfotericina B (0.5 mg/ml)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	Centrifuga refrigerada GS-6R	Beckman (Reino Unido)
Inmunofenotipo	Tampón fosfato (pH=7.0)		Placas 96 pocillos fondo V “serowell”	Bibby Sterilin Ltd. (Staffs, UK)
	Formaldehído 30-40%	Panreac Química SA (Barcelona, España)	Puntas de propileno virgen 200 µl y 1 ml	Daslab (Madrid, España)
	<u>Anticuerpos monoclonales conjugados con</u>	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): CD2, CD8, CD69, CD95, HLA-DR, anti-Fc ratón		
	IgGs control, CD11a, CD11b, CD45, CD45RA	Caltag Laboratories (Burlingame, California, USA)	Puntas 2, 20, 200 µl “Combitips plus”	Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania)
	Ficoeritrina (PE): IgGs control, CD8, CD11b, CD14, CD25, CD45RO, CD71	Caltag Laboratories	Tubos de 5ml poliestireno fondo redondo “falcon”	Becton-Dickinson Labware (NJ, USA)
	CD11c, CD28, CD38, CD40, CD45RO, CD56, CD62L, CD80, CD122, CD152, CD154	Becton-Dickinson	Pipetas de volumen ajustable Pipetman p20, 200, 1000	Gilson (Francia)
	TRICOLOR: IgGs control, CD14	Caltag Laboratories	Dispensador automático “Multipette plus”	Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania)
	Peridín clorofila proteína (PerCp): CD3, CD4	Becton-Dickinson		
	Aloficocianina (APC): CD3, CD4, CD8, CD19, CD45RO	Becton-Dickinson		
	Anti-CCR2, anti-CCR5 y anti-CXCR4 conjugados con biotina	Cedidos por el Dr. Carlos Martínez-A Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España)	Centrifuga multifuge 3S-R Heraeus	Kendro Lab. Products (Hanau, Alemania)
anti-CCR6 y anti-CXCR3		Citofluorímetro de flujo FACScalibur	Becton Dickinson, (Mountain View USA)	
Avidina conjugada con FITC	Becton-Dickinson			

Tabla 3.: Reactivos, materiales y aparatos utilizados en el procesamiento de las muestras agrupados por técnicas de laboratorio (continuación)

Citoquinas Intracelulares	Reactivos		Materiales y aparataje	
<p><u>Anticuerpos monoclonales conjugados con</u></p>	Medio de cultivo		Tubos 15 ml polipropileno	Labcenter SL (Madrid, España)
	Monensina	Sigma Chemical Co. (San Louis, Missouri, USA)	Puntas de propileno virgen 200 µl y 1 ml	Daslab (Madrid, España)
	Acetato 12-forbol 13-miristato (PMA)	Sigma Chemical Co. (San Louis, Missouri, USA)	Pipetas estériles graduadas 10 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Alemania)
	Ionomicina	Calbiochem-Novabiochem Corp. (California, USA)	Placas 24 pocillos "Multiwell Falcon"	Becton-Dickinson Labware (NJ, USA)
	Kit de fijación y permeabilización "fix&perm"	Caltag Laboratories (Burlingame, California, USA)	Placas 96 pocillos fondo V "serowell"	Bibby Sterilin Ltd. (Staffs, UK)
	Ficoeritrina (PE): anti-hIL4, anti-hIL6, anti-hTNFα, anti-IL1β	R&D, (Mineapolis, Minnesota, USA)	Tubos de 5ml poliestireno fondo redondo "falcon"	Becton-Dickinson Labware (NJ, USA)
	anti-hIL2, anti-hIL10, anti-hIFNγ	Caltag Laboratories (Burlingame, California, USA)	Pipetas Pasteur de cristal	Chase Instrument Corp. (Glen Falls, NY, USA)
	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): CD8	Becton-Dickinson Immunocytometry System, (San José, California, USA)	Puntas 2, 20, 200 µl "Combitips plus"	Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania)
Peridín clorofila proteína (PerCp): CD3	Becton-Dickinson Immunocytometry System, (San José, California, USA)	Pipetas de volumen ajustable Pipetman p20, 200, 1000	Gilson (Francia)	
Alofocianina (APC): CD45RO	Panreac Química SA (Barcelona, España)			
<p>Estudio de muerte celular programada (Apoptosis)</p> <p><u>Anticuerpos monoclonales conjugados con</u></p>	Medio de cultivo		Dispensador automático "Multipette plus"	Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania)
	Fitohemaglutinina M (PHA)	Difco Lab., (Detroit, Mi., USA)	Cámara de flujo laminar vertical Gelaire TC 48	Flows labs. (Alemania)
	Estaurosporina	Sigma Chemical Co. (San Louis, Missouri, USA)	Incubador CO ₂ "Hera cell"	Kendro Lab. Products (Hanau, Alemania)
	Kit rhAnexina V FITC	Bender Medsystem Diagnostic (Viena, Austria)	Centrífuga multifugue 3S-R Heraeus	Selecta (Tarrasa, España)
	Ficoeritrina (PE): CD4, CD8, CD45RO	Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA)	Baño termostatzado Tectron 3000543	
Alofocianina (APC): CD3	Becton-Dickinson Immunocytometry System, (San José, CA, USA)			
Calibrite beads	Becton-Dickinson Immunocytometry System, (San José, CA, USA)			
<p>Estudio de la capacidad fagocítica y oxidativa (radicales de NO)</p>	Kit de fagocitosis (Phagotest) y oxidación (Phagoburst)	Orpegen Pharma (Heidelberg, Alemania)	Citofluorímetro de flujo FACScan y FACScalibur	Becton Dickinson, (Mountain View USA)

4. Obtención de muestras biológicas

a) Sangre venosa: tanto a los pacientes diagnosticados de Pancreatitis aguda como a los controles sanos se les extrajo 30 ml de sangre venosa, en tubos con heparina de litio, por punción venosa antecubital. En condiciones de esterilidad, se separó la sangre en tubos de 50ml fondo cónico y se diluyó 1/1 (vol/vol) con suero salino fisiológico (SSF) mezclando suavemente.

b) Células mononucleares de sangre periférica: para el aislamiento de las CMNSP se procedió a su separación del resto de los componentes de la sangre mediante la formación de un gradiente de densidad sobre Ficoll (1.077 g/ml). Este método se basa en las diferencias de densidad de la sangre humana. Utilizando una pipeta de 10ml estéril y una bomba de aire para pipeteo, "Pipetus", se inyecta 1/3 de volumen de ficoll (*la sangre es menos densa y queda por encima del ficoll*) y se centrifuga a 520 x g durante 45 min. Se obtienen tres fases (eritrocitos, ficoll y plasma), separadas por dos interfases; la situada entre el Ficoll y el plasma diluido contiene las CMNSP, se recoge la banda aspirando con el pipetus y una pipeta 10ml estéril. Las células aspiradas se lavan dos veces con 50ml de SSF a 380 x g durante 10 min para eliminar el ficoll, sustancia tóxica, y se resuspenden las células en 10ml de medio completo (Current Protocols in Immunology, 1992b).

5. Recuento y estudio de viabilidad

En todas las suspensiones celulares se determinó la concentración celular y la viabilidad mediante la dilución 1/2 con Azul Tripán al 0.1% y recuento con microscopio óptico (40 aumentos) en cámara de contaje Neubauer. El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante (*las células muertas permeabilizan su membrana y captan el tripán volviéndose de color azul*). Sólo se prosiguió el experimento en aquellos casos en que la viabilidad celular fue superior al 95% (Current Protocols in Immunology, 1992d).

células/ml = media 4 cuadrantes x inversa de la dilución x 10,000

$$(0.1\text{mm} \times 1\text{mm}^2 = 0.1\text{mm}^3 = 10^{-3} \text{ ml})$$

profundidad x área

6. Estudios inmunofenotípicos y funcionales

La tabla redactada a continuación contiene información relevante sobre los anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio inmunofenotípico, el estudio de muerte celular programada (apoptosis) y el estudio de expresión de citoquinas intracelulares: clon utilizado, subclase de Ig, fluorocromo con el que esta conjugado y población celular que expresa la proteína indicada.

Tabla 6.: Anticuerpos monoclonales utilizados en los estudios inmunofenotípicos y funcionales

Ac. Mo.	Clon	Población celular definida	Subclase Ig †	Fluorocromo
CD2	S5.2	Células T, timocitos, células NK	IgG2a	FITC
CD3	SK7	Timocitos, células T	IgG1	PerCp, APC
CD4	S3.5	Subpoblaciones de timocitos, células Th1 y Th2 (alrededor de 2/3 de las células T periféricas), monocitos y macrófagos	IgG2a	PE
	SK3		IgG1	PerCp, APC
CD8	SK1	Subpoblaciones de timocitos , células T citotóxicas (alrededor de 1/3 de las células T periféricas)	IgG1	FITC
	3B5		IgG2a	PE, APC
CD11-a	MEM-25	Linfocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos: se une a CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) y CD50 (ICAM-3)	IgG1	FITC
CD11b	MEM-170	Células mieloides y NK: se une a CD54, al componente iC3b del complemento y a proteínas de la matriz extracelular	IgG1	PE
CD11c	S-HCL-3	Células mieloides: une fibrinógeno	IgG2b	PE
CD14	Tük 4	Células mielomonocíticas, >84% monocitos y algunos granulocitos	IgG2a	PE
CD19	SJ25C1	Células B	IgG1	APC
CD25	CD25-3G10	Células T activadas, células B y monocitos	IgG1	PE
CD28	L293	Subpoblaciones de células T (>90%), células B activadas: activación de T naïves, el receptor para una señal coestimuladora, une CD80 y CD86	IgG1	PE
CD38	HB7	Células B y T tempranas, células T activadas, células B de centro germinal y células plasmáticas: aumenta la proliferación de células T	IgG1	PE
CD40	5C3	Células B, macrófagos, células dendríticas, células de epitelio basal: une CD154, receptor de la señal coestimuladora de las células B, promueve el crecimiento, la diferenciación y el cambio de isotipo de las células B y las células dendríticas	IgG1	PE
CD45	H130	Todas las células hematopoyéticas: presenta múltiples formas por procesamiento alternativo	IgG1	FITC
CD45RA	MEM-56	Células B, subpoblaciones de células T(células T naïves), monocitos	IgG2b	FITC, PE
CD45RO	UCHL-1	Subpoblaciones de células T y B (células activadas/memoria), monocitos y macrófagos	IgG2a	PE, APC

Tabla 6.: Anticuerpos monoclonales utilizados en los estudios inmunofenotípicos y funcionales (continuación)

Ac. Mo.	Clon	Población celular definida	Subclase Ig †	Fluorocromo
CD56	NCAM16.2	>95% Células NK, <5% células T	IgG2b	PE
CD62L	SK11	Células B, células T, células NK y monocitos: une CD34, GlyCAM, media las interacciones rodantes con el endotelio	IgG2a	PE
CD69	L78	Células T y B activadas, células NK activadas y macrófagos: antígeno de activación temprana	IgG1	FITC
CD71	T56/14	Células T y B activadas, macrófagos, células proliferando	IgG1	PE
CD80	L307.4	Subpoblación de células B: coestimulador, ligando de CD28 y CTLA-4	IgG1	PE
CD95	DX2	Amplia variedad de líneas celulares, distribución <i>in vivo</i> incierta: induce apoptosis a través de Fas ligando	IgG1	PE
CD122	TU27	Células NK, subpoblaciones de células T en reposo, algunas líneas de células T	IgG1	PE
CD152	BNI3	Células T activadas: receptor de CD80 y CD86: regulador negativo de la activación de las células T	IgG2a	PE
CD154	89-76	Células T CD4 activadas: ligando de CD40: inductor de proliferación y la activación de células B	IgG1	PE
HLA-DR	TÜ36	Células B y células T activadas	IgG2b	FITC
CCR2	CCR2-05	Monocitos, células B, linfocitos T activados/memoria (Th1), células NK estimuladas por ligando o IL2: promueve recirculación de células B y T a órganos linfoides primarios y secundarios	IgG2b	Biotinado
CCR5	CCR5-02	Monocitos CD14+CD16+, células T activadas (Th1), células NK estimuladas, células dendríticas inmaduras, células CD34+ de sangre periférica: promueve recirculación de células dendríticas y linfocitos B y T a órganos linfoides primarios y secundarios	IgG2b	Biotinado
CCR6	CCR6-4e	Células B naïves, células T CD45RO+, células dendríticas inmaduras, células dendríticas derivadas de precursores CD34+ de cordón umbilical: recirculación de células T activadas en tejido hacia nódulos linfoides o tejidos linfoides ectópicos, maduración de células B, migración de células dendríticas hacia áreas ricas en células T o focos de lesión	IgG2b	—
CXCR3	CXCR3-AAK3	Células B, células T memoria activadas (Th1), células NK, células hematopoyéticas, eosinófilos, células dendríticas maduras: controla la recirculación de células dendríticas y linfocitos a órganos linfoides primarios y secundarios para su activación	IgG2b	—
CXCR4	CXCR4-01	Timocitos, células T (Th1), células B naïve, mastocitos, eosinófilos estimulados: implicado en el desarrollo, maduración y recirculación de precursores hematopoyéticos, mielopoyesis y linfopoiesis. Promueve recirculación de células dendríticas y células B y T a órganos linfoides primarios y secundarios	IgG2b	Biotinado

Tabla 6.: Anticuerpos monoclonales utilizados en los estudios inmunofenotípicos y funcionales (continuación)

Ac. Mo.	Clon	Población celular definida	Subclase Ig †	Fluorocromo
rhIL1 β	8516.311	Macrófagos, células epiteliales: fiebre, activación de células T y macrófagos	IgG1	PE
rhIL2	MQ1-17H12	Células Th1: proliferación de células T	IgG2a	PE
rhIL4	3007	Células Th2, mastocitos: activación de células B, cambio a IgE, suprime las células Th1	IgG1	PE
rhIL6	1936.141	Células T, macrófagos y células endoteliales: diferenciación y crecimiento de células T y B, proinflamatoria (producción de proteína de fase aguda, fiebre)	IgG2b	PE
rhIL10	JES3-9D7	Células T, macrófagos, células B transformadas por EBV: antiinflamatoria (supresor potente de la función de los macrófagos)	IgG1	PE
rhTNF α	6402.31	Macrófagos, células NK, células T: proinflamatoria (inflamación local, activación endotelial)	IgG1	PE
rhIFN γ	B27	Células Th1 y células NK: activación de macrófagos, expresión aumentada de moléculas de MHC y componentes del procesamiento de antígenos, cambio de clase de Ig, suprime Th2	IgG1	PE

CDs (cluster de diferenciación) definidos en el "7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens". (<http://www.mh-hannover.de/aktuelles/projekte/hlda7/hldabase/cdindex.htm>)

† Indica la subclase murina del AcMo

Abreviaturas: FITC, isocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridín clorofila proteína; APC, alofocianina

El método utilizado para la generación de los anticuerpos monoclonales anti-quimiorreceptor está descrito en "Mellado M y cols. Journal of Biological Chemistry 1997; 272 (14): 9189-9196"

7. Análisis fenotípico de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo semicuantitativa (FACScalibur)

Los diferentes subtipos celulares obtenidos de las preparaciones de sangre periférica, así como la fiabilidad de la separación se caracterizaron mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconocen proteínas de superficie específicas de cada subpoblación. Los AcMo utilizados, subclases y denominación CD se exponen en la **Tabla 6**.

(Current Protocols in Immunology, 1992e).

7.1. Marcaje con AcMo: se empleó la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta de cuádruple color, utilizando AcMo de ratón conjugados con fluoresceína FITC, PE, PerCp o Tri-Color y APC, AcMo de ratón conjugados con biotina revelados con avidina FITC y AcMo de ratón sin conjugar revelados con anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de ratón. La **Tabla 7.1**. describe la combinación de anticuerpos monoclonales utilizada.

Siguiendo el panel expuesto en la **Tabla 7.1**. se siembran las células en una placa de 96 pocillos fondo V (200.000 células/pocillo), se retira el sobrenadante (130 x g durante 5 min) y se resuspende el pellet. Se incuban las células con 20 µl de AcMo de inmunofluorescencia indirecta durante 20 min a 4°C y en oscuridad. Se realiza un lavado con 200 µl de PBS (130 x g, 5 min), se resuspende el pellet y se incuban las células con 5 µl de avidina-FITC (dilución 1/20 en PBS), para los anticuerpos biotinados y 5 µl de goat-anti-mouse-FITC (dilución 1/10 en PBS) para los anticuerpos puros, durante 20 min a 4°C y en oscuridad. Se realiza otro lavado con PBS y se incuba con 5 µl de los AcMo de fluorescencia directa. Para su posterior adquisición en citómetro de flujo FACScalibur se añaden 200 µl de formaldehído 1% y se traslada el volumen a tubos de poliestireno de 5ml fondo redondo (tubos de FACS).

7.2. Adquisición y análisis: Para el recuento se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur dotado con un módulo de discriminación de dobletes (DDM) bajo el control del software CellQuest 3.01 (Becton Dickinson California, USA). El aparato, además de los canales de fluorescencia, aporta información sobre el tamaño (FSC) y la complejidad celular (SSC). Como controles negativos, se utilizaron las células a estudiar sin marcar y marcadas con AcMo irrelevantes de los mismos isotipos que los utilizados en el estudio (IgG1-FITC, IgG2a-FITC, IgG2a-PE, IgG2a-Tri-Color) (Current Protocols in Immunology, 1992f).

Tabla 7.1.: Panel de anticuerpos monoclonales utilizado en el estudio inmunofenotípico

N° Tubo	FITC	PE	PerCp o Tri-color	APC
1	IgG control	IgG control	IgG control	
2	Células sin marcar	Células sin marcar	Células sin marcar	Células sin marcar
3	CD45	CD14		
4	CD8	CD25	CD4	CD3
5	CD8	CD122	CD4	CD3
6	CD45RA	CD45RO	CD4	CD8
7	CD69	CD71	CD4	CD8
8	CD11a	CD38	CD3	CD19
9	CD2	CD56	CD3	CD19
10	CD8	CD28	CD4	CD3
11	CD8	CD152	CD3	CD4
12	HLA-DR	CD154	CD3	CD19
13	CD95	CD8	CD3	CD4
14	CD8	CD62L	CD4	CD3
15	CD11a	CD11c	CD14	
16	HLA-DR	CD80	CD14	
17	CD11b	CD62L	CD14	
18	HLA-DR	CD40	CD14	
19	CCR2	CD8	CD4	CD3
20	CCR2	CD25	CD4	CD8
21	CCR2	CD28	CD4	CD8
22	CCR2	CD45RA	CD3	CD45RO
23	CCR2	CD56	CD3	CD19
24	CCR2	CD11b	CD3	CD19
25	CCR5	CD8	CD4	CD3
26	CCR5	CD25	CD4	CD8
26	CCR5	CD28	CD4	CD8
27	CCR5	CD45RA	CD3	CD45RO
28	CCR5	CD56	CD3	CD19
29	CCR5	CD11b	CD3	CD19
30	CCR6	CD8	CD4	CD3
31	CCR6	CD25	CD4	CD8
32	CCR6	CD28	CD4	CD8
33	CCR6	CD45RA	CD3	CD45RO
34	CCR6	CD56	CD3	CD19
35	CCR6	CD11b	CD3	CD19
36	CXCR3	CD8	CD4	CD3
37	CXCR3	CD25	CD4	CD8
38	CXCR3	CD28	CD4	CD8
39	CXCR3	CD45RA	CD3	CD45RO
40	CXCR3	CD56	CD3	CD19
41	CXCR3	CD11b	CD3	CD19
42	CXCR4	CD8	CD4	CD3
43	CXCR4	CD25	CD4	CD8
44	CXCR4	CD28	CD4	CD8
45	CXCR4	CD45RA	CD3	CD45RO
46	CXCR4	CD56	CD3	CD19
47	CXCR4	CD11b	CD3	CD19
48	Avidina			
49	Anti-mouse			

8. Estudios funcionales mediante citometría de flujo semicuantitativa (FACScalibur)

8.1. Condiciones generales de cultivo: Todos los cultivos celulares se desarrollaron en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar vertical, empleando materiales estériles de un único uso o esterilizados en autoclave o con óxido de etileno. Los cultivos se realizaron en un incubador de CO₂ que mantenía una temperatura de 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

8.2. Expresión de citoquinas intracelulares en linfocitos T

Incubamos 6x10⁶ células en medio completo (control negativo) con monensina (2µM), un inhibidor de la síntesis de microtúbulos (bloqueamos la exocitosis) y 6x10⁶ células en medio completo con monensina (2 µg/ml), acetato de 12-forbol 13-miristato (PMA) (50 ng/ml), estímulo policlonal de células T, e ionomicina (1µg/ml), ionóforo de calcio para potenciar el efecto del PMA, en tubos de polipropileno de 15ml durante 6h.

Sembramos las células cultivadas en una placa de 96 pocillos fondo en V (300.000 células/pocillo), retiramos el sobrenadante (130 x g, 5 min) y resuspendemos el pellet. Incubamos con 5µl de los Ac. Mo. de superficie siguiendo el panel expuesto en la **Tabla 8.2.** durante 20 min a 4°C y en oscuridad. Utilizamos el kit comercial Fix&Perm (Caltag Laboratories) según protocolo estándar, fijamos con 50 µl de la solución fijadora A durante 15 min a temperatura ambiente, lavamos con 200 µl de PBS (130 x g, 5 min). Añadimos 30 µl de la solución permeabilizadora B y los Ac. Mo. anti-citoquinas, incubamos 20 min a 4°C y en oscuridad y lavamos con 200 µl de PBS para retirar la solución permeabilizadora y el exceso de anticuerpo. Para su posterior adquisición en citómetro de flujo FACScalibur se añaden 200 µl de formaldehído 1% y se traslada el volumen a tubos de FACS.

Tabla 8.2.: Panel de anticuerpos monoclonales utilizado en el estudio de citoquinas intracelulares

Nº de tubo	FITC	PE	PerCp	APC
1	IgG control	IgG control	IgG control	
2	Células sin marcar	Células sin marcar	Células sin marcar	Células sin marcar
3	CD45	CD14		
4	CD8	IL2	CD3	CD45RO
5	CD8	IL4	CD3	CD45RO
6	CD8	IL6	CD3	CD45RO
7	CD8	IL10	CD3	CD45RO
8	CD8	IFN-γ	CD3	CD45RO
9	CD8	TNF-α	CD3	CD45RO
10	CD8	IL-1 β	CD3	CD45RO

8.3. Muerte celular programada (apoptosis) en linfocitos T

La *anexina* es una molécula biológica presente en la superficie de células con capacidad fagocítica, capaz de reconocer y unirse a la fosfatidil-serina. Cuando una célula entra en apoptosis uno de los primeros cambios que se producen en su membrana es el intercambio de lípidos entre las dos capas lipídicas que la forman, la fosfatidil-serina pasa de la cara interna a la cara externa de la membrana. La *Anexina V* es una proteína presente en la superficie de células fagocíticas capaz de unirse con una alta especificidad a la fosfatidilserina, esto permite a dichas células reconocer a las células que han entrado en apoptosis y eliminarlas por fagocitosis. De esta manera el uso de Anexina V conjugada con un fluorocromo nos permite visualizar en un citómetro células en fase temprana de apoptosis. Para descartar aquellas células que mueren por necrosis utilizamos 7 aminoactinomicina D (7-AAD), un intercalador de ADN que emite fluorescencia en el canal FL-3, las células muertas permeabilizan su membrana y permiten el paso de la 7-AAD, aquellas que captan 7-AAD pero no anexina son células que han sufrido necrosis.

Cultivamos 1×10^6 de células en presencia de medio completo (control negativo), 1×10^6 de células medio completo con PHA ($10 \mu\text{g/ml}$), un estímulo policlonal de células T, y 1×10^6 de células en medio completo con estaurosporina ($5 \mu\text{M}$), un potente inductor de apoptosis (control positivo), en placas de 24 pocillos fondo plano durante 24 horas. Sembramos las células en tubos de FASC (100.000 células/tubo) e incubamos con $5 \mu\text{l}$ de Ac. Mo., siguiendo el panel de la **Tabla 8.3.**, durante 20 min a 4°C y en oscuridad. Retiramos el medio el cultivo ($380 \times \text{g}$ durante 10 min) e incubamos con $6 \mu\text{l}$ de anexina V FITC en un volumen añadido de $50 \mu\text{l}$ de HEPES Buffer (kit rhanexina V FITC). Momentos antes de su adquisición en el citómetro de flujo (FACScalibur) añadimos $100 \mu\text{l}$ de microbeads (dilución 1/100 en HEPES buffer) como estándar externo de recuento celular y $100 \mu\text{l}$ de 7-AAD para descartar la muerte celular por necrosis. Es fundamental resuspender muy bien la solución de microbeads antes de añadirla a los tubos y previamente a la adquisición para evitar que se depositen en el fondo de los tubos.

Mediante las técnicas disponibles en el software detenemos la adquisición de eventos en un número determinado de microbeads, de esta manera obtenemos un estándar externo constante al que referir los eventos adquiridos y así poder comparar diferentes tiempos y condiciones dentro de un mismo experimento (559).

Tras su análisis mediante el software adecuado obtenemos dos parámetros indicadores de apoptosis el *índice de apoptosis (AI)*, que muestra el porcentaje de células apoptóticas al término del cultivo respecto del 100% de células totales, y el *ratio de apoptosis (AR)*, que incluye en la fórmula las células que sufren apoptosis en el momento de la medición y aquellas células que, habiendo sufrido apoptosis en momentos previos, han pasado a ser fragmentos o cuerpos apoptóticos (559). Así pues, el ratio de apoptosis es una medida mas exacta de la apoptosis real sufrida por las células ante los diferentes estímulos.

$$AI = \text{n}^\circ \text{ de células apoptóticas} / (\text{n}^\circ \text{ de células apoptóticas} + \text{n}^\circ \text{ de células no apoptóticas})$$

$$AR = (\text{n}^\circ \text{ células apoptóticas} + \text{n}^\circ \text{ fragmentos}) / \text{n}^\circ \text{ células sembradas}$$

↓

$$\text{N}^\circ \text{ fragmentos} = \text{n}^\circ \text{ células sembradas} - \text{n}^\circ \text{ células recogidas}$$

Tabla 8.3.: Panel de anticuerpos monoclonales utilizado en el estudio de apoptosis

Nº Tubo	FITC	PE	FL-3	APC
1	Ig	Ig	Ig	
2	Células sin marcar	Células sin marcar	Células sin marcar	Células sin marcar
3	CD45	CD14		
4	Anexina V	CD4	7-AAD	CD3
5	Anexina V	CD8	7-AAD	CD3
6	Anexina V	CD45RO	7-AAD	CD3

9. Estudio de la capacidad fagocítica y generación de radicales libres de oxido nítrico (NO) en monocitos mediante citometría de flujo semicuantitativa (FACScalibur)

Dispensamos 100 µl de sangre completa en tubos de adquisición según el panel de la **Tabla 9** y añadimos respectivamente 20 µl de washing buffer (tubo control) y 20 µl de cada estímulo: *E.Coli* FITC para el *estudio de la capacidad fagocítica* y *E.Coli* sin marcar, fMLP (control negativo) y TPA (control positivo) para el *estudio de generación de radicales libres de NO*. Agitamos suavemente en el vortex e incubamos 10 min a 37°C en un baño termostatzado. Tras la incubación ponemos las muestras en hielo durante 5 min para frenar la reacción y añadimos 20 µl de la sonda (rodamina) a los tubos del *estudio de generación de radicales de NO* (reacciona con los radicales libres y fluoresce en el rango de FL-1), agitando suavemente, y 100 µl de solución de quenching a los tubos del *estudio de fagocitosis* (anula la

fluorescencia emitida por las bacterias no fagocitadas adheridas al exterior de la célula) agitando vigorosamente. Incubamos los tubos con la sonda durante 10 min a 37°C, tras lo cual ponemos las muestras en hielo durante 5 min para frenar la reacción, y lavamos la solución de quenching con 4 ml de solución de lavado (380 x g durante 5 min), aspirando el sobrenadante y resuspendiendo.

Efectuamos la lisis de hematíes mediante choque osmótico. Añadimos 1 ml de solución de lisis 1x en agua destilada, agitamos en el vortex e incubamos 12 min a T^a ambiente y en oscuridad, lavamos dos veces con 2 ml de solución de lavado (380 x g durante 5 min), aspiramos el sobrenadante y resuspendemos en el vortex. Por último, añadimos 100 µl de Ioduro de Propidio (PI) (revela células muertas y dobletes), incubamos en hielo 15 min y dispensamos 100 µl de PBS para adquirir en el Citómetro de Flujo (compensamos con el tubo control y no variamos la compensación para adquirir el resto de los tubos).

Tabla 9.: Panel de tubos para el estudio de fagocitosis y generación de radicales libres de oxido nítrico (NO)

	Nº Tubo	1ª incubación	2ª incubación	Quenching	Solución de lisis	PI
Tubo control	1	Solución de lavado		SI	SI	SI
Fagocitosis	2	E. coli FITC		SI	SI	SI
Tubo control	3	Solución de lavado	Sonda rodamina	NO	SI	SI
Oxidación	4	E. coli	Sonda rodamina	NO	SI	SI
Oxidación	5	FMLP	Sonda rodamina	NO	SI	SI
Oxidación	6	TPA	Sonda rodamina	NO	SI	SI

10. Análisis estadístico

Para determinar el tipo de test estadístico adecuado al estudio realizado, se analizó la naturaleza de las distribuciones empleando el contraste de *normalidad* de *Kolmogorov-Smirnov*. Los datos obtenidos no siguieron distribuciones normales, por lo que se emplearon Test no-paramétricos al efectuar comparaciones entre las distintas muestras, la *U de Mann-Whitney* para comparar pacientes y controles (estadística no pareada), y grupos de pacientes entre sí, y el *Test de Wilcoxon* para comparar los diferentes tiempos estudiados dentro de un mismo paciente o control (estadística pareada). En todos los casos, se valoraron niveles de significación por debajo del 5% y 0.5% ($p < 0.05$ y $p < 0.005$). Los resultados se expresan como *mediana* y *percentiles 25* y *75*. El software utilizado en el procesamiento estadístico fue SPSS 11.0.

RESULTADOS

La Pancreatitis aguda es un proceso inflamatorio agudo de gravedad variable que produce alteraciones en los diferentes compartimentos del sistema inmune debido a los efectos colaterales del microambiente inflamatorio. En los casos de gravedad extrema las alteraciones del sistema inmune afectan a otros órganos generando fallo respiratorio, alteraciones metabólicas, fallo renal y shock séptico lo que en un porcentaje muy alto desencadena el fallo multiorgánico y la muerte.

1. Datos clínicos y analíticos

Seleccionamos 46 pacientes, 22 mujeres y 24 varones, con una edad media de 68 años (rango 54-78). Los pacientes fueron clasificados en dos grupos según criterios de gravedad basados en el Índice de Ranson y la Clasificación de Atlanta. Aquellos pacientes con un Índice de Ranson ≤ 3 y que no desarrollaron complicaciones superando el brote inflamatorio en un tiempo máximo de 7 días fueron incluidos en el grupo de pacientes con **pancreatitis aguda leve (PAL)**, mientras que aquellos que obtuvieron una puntuación >3 en el Índice de Ranson y desarrollaron complicaciones que requirieron aporte de cuidados intensivos se incluyeron en el grupo de pacientes con **pancreatitis aguda grave (PAG)**. La *etiología* de los pacientes fue mayoritariamente *biliar*, 67%, seguida de la *etélica*, 22%, solo un 11% correspondió a otras causas. El estudio de la etiología en cada uno de los grupos revela una distribución similar con mayoría de pacientes con patología biliar frente a la patología etélica, 62% y 24% respectivamente en PAL y 76% y 18% en PAG. Respecto a la predominancia de una causa u otra en función del sexo cabe destacar la ausencia de mujeres con patología etélica y en consecuencia la equiparación entre patología biliar y etélica en varones.

En la **Tabla 1.1.** expuesta a continuación se resumen los datos clínicos fundamentales necesarios para el diagnóstico de los pacientes. El estudio tanto de los parámetros inmunológicos como de los parámetros clínicos fue realizado en 3 tiempos durante el episodio inflamatorio: dentro de las primeras 12 horas del inicio del brote (*basal*), a las 48 horas tras el inicio del brote y a los 5 días. Sin embargo no todas las variables clínicas fueron medidas en todos los tiempos ya que los protocolos de seguimiento no coincidieron con los puntos del estudio. Los resultados derivados de las medidas clínicas se utilizaron en la clasificación de los pacientes y no constituyen en sí mismo un objetivo de estudio.

Tabla 1.1.: Características clínicas de los grupos definidos de acuerdo a la gravedad de la patología

	Pancreatitis aguda leve			Pancreatitis aguda grave		
n	29			17		
Edad	65 (48-75)			76 (56-82)		
Sexo (M /V)	13 / 16			9 / 8		
Tiempo de evolución	basal	48 horas	5 días	basal	48 horas	5 días
N° leucocitos x10³ /µl	9.4 (7.6-11.3)	8.0 (5.2-10.4)	6.8 (5.9-8.5)	11.7 (8.6-16.9)	9.1 (6.9-17.6)	12.3 (7.4-19.7)
N° neutrófilos x10³ /µl	7.4 (4.6-9.0)	4.2 (2.9-7.9)	4.4 (3.2-6.0)	10.9 (6.3-13.5)	6.4 (5.3-11.4)	9.2 (4.4-16.8)
N° linfocitos x10³ /µl	1.6 (1.0-1.9)	1.9 (1.5-2.3)	1.9 (1.6-2.1)	1.0 (0.6-1.5)	1.3 (0.6-1.6)	1.7 (1.3-2.0)
N° monocitos x10³ /µl	0.5 (0.3-7.0)	0.5 (0.3-0.6)	0.4 (0.2-0.6)	0.6 (0.5-0.9)	0.8 (0.3-1.0)	0.8 (0.5-0.9)
Amilasa	589 (222-1705)			1611 (263-2651)		
Lipasa	275 (168-837)			83 (53-731)		
Calcio	9 (8-9)			9 (7-10)		
GPT	105 (34-243)			178 (33-328)		
GOT	49 (20-89)			73 (34-126)		
GGT	110 (50-431)			380 (126-503)		
Fosfatasa alcalina	186 (117-621)			189 (121-277)		
Bilirrubina	1.1 (0.8-1.6)			2.1 (1.0-9.2)		
PCR (CRP)	48 (13-165)			86 (23-142)		
Creatinina	0.9 (0.8-1.1)			1.1 (0.9-1.3)		

Hallazgos clínicos y analíticos de los subgrupos de pacientes con pancreatitis aguda definidos en función de criterios de gravedad basados en el Índice de Ranson y la Clasificación de Atlanta. Los valores se representan como la mediana y el rango intercuartílico (percentil 25-percentil 75).

Los datos clínicos observados en los pacientes en el momento de su admisión hospitalaria son los característicos de la patología estudiada, marcada leucocitosis y elevación de amilasa y lipasa junto con otras variables clínicas determinantes para el diagnóstico de pancreatitis aguda. Las técnicas de imagen que incluyeron la ecografía abdominal y el TAC fueron utilizadas como pruebas complementarias en el diagnóstico de gravedad de los pacientes.

El rasgo predominante de estos pacientes desde el punto de vista inmunológico es la marcada leucocitosis respecto a controles sanos ($p < 0.001$), mas elevada en PAG que en PAL, en el momento de la admisión hospitalaria debida fundamentalmente a un aumento de neutrófilos ($p < 0.001$). Tras 48 horas de evolución del brote inflamatorio se redujo significativamente el número leucocitos normalizándose los niveles en PAL mientras que PAG mantenía la leucocitosis, sin embargo ambos grupos de pacientes incrementaron de

nuevo los niveles respecto a controles sanos al 5° día de iniciado el episodio agudo ($p < 0.05$ PAL y $p < 0.001$ PAG). Un comportamiento similar en el número de neutrófilos fue observado durante el brote en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, y dado que los objetivos de nuestro estudio se centran en linfocitos y monocitos, resulta más interesante la acusada linfopenia que presentan tanto PAL como PAG ($p < 0.001$) y la monocitosis observada en PAG ($p < 0.001$) respecto a los valores control al inicio del brote. El número de linfocitos fue significativamente menor en PAG respecto a PAL durante la progresión del brote hasta equiparse los niveles al 5° día, ambos grupos de pacientes experimentan un progresivo aumento del número de linfocitos que normaliza los niveles en PAL en las primeras 48 horas, mientras que PAG no llega a alcanzar los niveles control manteniéndose la linfopenia durante todo el estudio ($p < 0.001$). Respecto al número de monocitos, PAL mantuvo los niveles dentro del rango control conforme progresaba el episodio agudo aunque observamos un leve descenso no significativo a las 48 horas, sin embargo PAG experimentó un incremento significativo a las 48 horas respecto a controles ($p < 0.001$) y PAL que se mantuvo al 5° día de iniciado el brote.

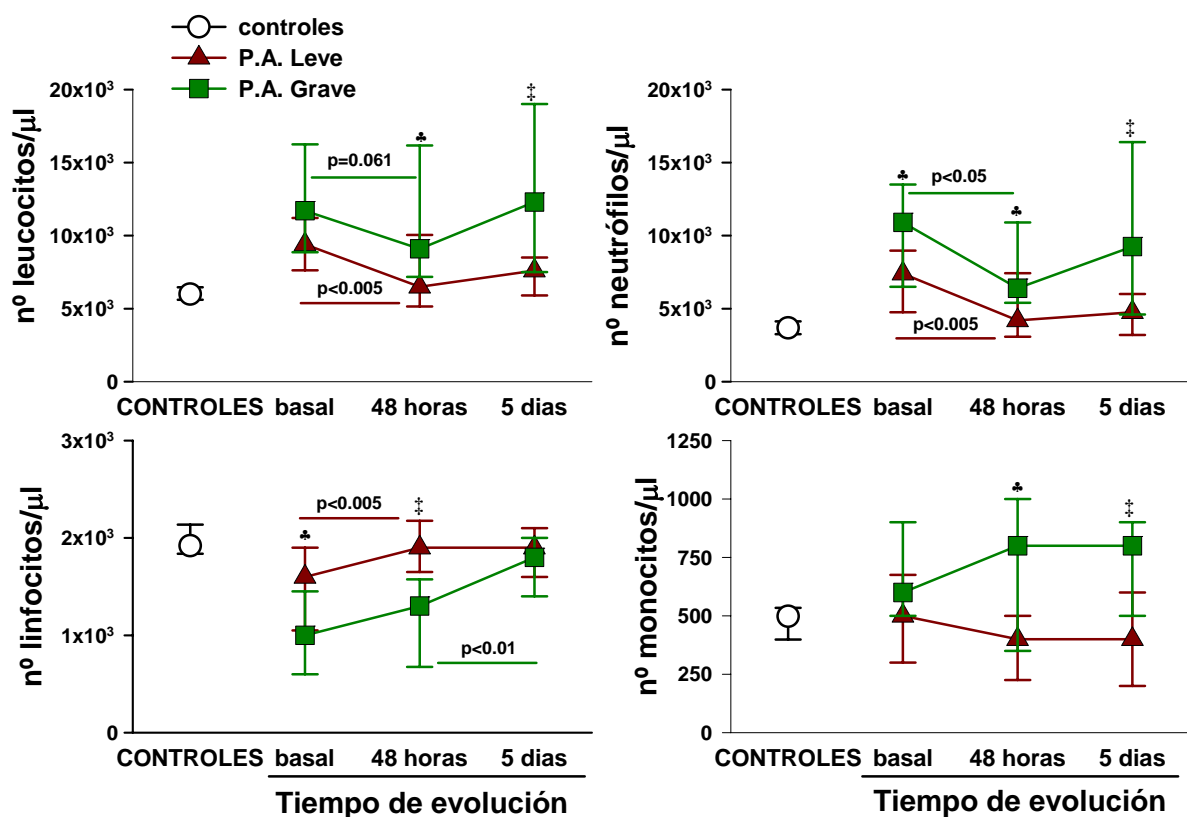


Figura 1: evolución del número de leucocitos, neutrófilos, monocitos y linfocitos en pacientes con pancreatitis aguda durante el brote inflamatorio. Se representa la mediana y los percentiles 75 y 25. † $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ en pacientes con PA leve respecto a pacientes con PA grave

2. Estudio de las principales poblaciones linfocitarias y subpoblaciones de linfocitos T

2.1. Alteraciones en el número y la distribución de las poblaciones linfocitarias

Iniciamos nuestro estudio cuantificando el número absoluto y la distribución porcentual de linfocitos T, linfocitos B y células NK en sangre periférica de pacientes con pancreatitis aguda al ingreso hospitalario, a las 48 horas y a los 5 días de evolución tras el inicio del brote. Se analizaron de forma comparativa los resultados obtenidos en los pacientes con dos formas evolutivas de la enfermedad, PA leve y PA grave. Se analizó de forma simultánea una población control de individuos sanos con similar distribución en edad y sexo a la de los pacientes.

Tanto los pacientes con PAL como aquellos diagnosticados de PAG mostraron una disminución del número de linfocitos T (CD3+) ($p < 0.001$) y linfocitos B (CD19+) ($p < 0.001$) y un aumento de células NK (CD3-CD56+) ($p < 0.001$ PAL y $p < 0.05$ PAG) al inicio de los síntomas (tiempo basal) respecto a controles sanos. Las cifras absolutas de linfocitos T de ambos grupos de pacientes aumentaron a los dos y cinco días de evolución, pero se mantuvieron estadísticamente inferiores a las encontradas en los controles sanos. A las 48 horas de evolución los valores de estos linfocitos T permanecían significativamente decendidos en los PAG con respecto a los PAL. Un comportamiento similar se observó en el compartimento linfocitario B, pero con la salvedad de la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes a lo largo de la evolución. Por el contrario las cifras de células NK, aunque disminuyeron en los enfermos a lo largo de los cinco días de seguimiento, permanecieron significativamente elevadas con respecto a los sujetos controles sanos en los diferentes momentos del estudio. (Tabla 2.1.1 y figura 2.1).

El análisis de la distribución de estas poblaciones en el total de linfocitos circulantes demuestra que al inicio de los síntomas el porcentaje de linfocitos T se encuentra disminuido y el de células NK aumentado en los pacientes y tienden a normalizarse con la evolución del brote sin equiparse al porcentaje observado en controles sanos ($p < 0.001$). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en el estudio del número de células, se observa un porcentaje de linfocitos B dentro del rango control al inicio del brote en ambos grupos que disminuyó a las 48 horas ($p < 0.005$ en PAL, NS en PAG) para mantenerse sin cambios al 5° día en PAG y retornar a los valores basales en PAL pero sin alcanzar los de los controles ($p < 0.005$). El estudio comparativo de las dos formas evolutivas de la enfermedad reveló un porcentaje

de linfocitos T inferior en pacientes PAG respecto a pacientes PAL al comienzo de los síntomas y en las primeras 48 horas que se igualó al 5° día de evolución del brote, sin embargo estas diferencias se invierten en linfocitos B y células NK siendo los niveles superiores en pacientes con PAG respecto a aquellos con la forma leve en las primeras 48 horas de la fase aguda (Tabla 2.1.2 y figura 2.1)

Tabla 2.1.1: Número de linfocitos T, linfocitos B y células NK en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25–percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CD3+	1508 (1441-1618)	PAL	1079 (644-1216) ^a	1423 (1180-1523) ^b	1376 (1156-1600) ^b
		PAG	618 (373-1025) ^{a,d}	845 (388-1059) ^{a,c}	1243 (956-1543) ^a
CD19+	209 (161-258)	PAL	111 (89-188) ^a	110 (95-151) ^a	153 (145-184) ^a
		PAG	107 (78-178) ^a	116 (51-135) ^a	154 (105-211) ^b
CD3-CD56+	240 (179-288)	PAL	417 (240-526) ^a	441 (317-535) ^a	337 (270-421) ^a
		PAG	320 (156-399) ^b	334 (169-424) ^b	266 (232-394) ^b

Tabla 2.1.2: Distribución de linfocitos T, linfocitos B y células NK respecto al total de linfocitos en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25–percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CD3+	76.92 (74.74-81.50)	PAL	63.59 (61.28-66.92) ^a	71.17 (70.44-75.11) ^a	72.66 (69.31-76.11) ^a
		PAG	61.32 (51.53-64.49) ^{a,d}	66.20 (62.24-67.01) ^{a,c}	73.64 (65.97-76.11) ^a
CD19+	10.56 (8.38-13.31)	PAL	9.26 (6.28-11.95)	6.11 (4.54-8.07) ^a	8.21 (7.22-9.36) ^a
		PAG	11.90 (8.20-13.32)	8.97 (7.72-11.10) ^c	8.93 (7.60-13.55)
CD3-CD56+	11.72 (9.29-14.87)	PAL	26.87 (23.50-30.09) ^a	21.30 (18.96-25.26) ^a	20.17 (14.85-22.93) ^a
		PAG	28.17 (23.72-36.62) ^a	25.95 (22.24-28.04) ^{a,d}	16.95 (13.49-19.67) ^a

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

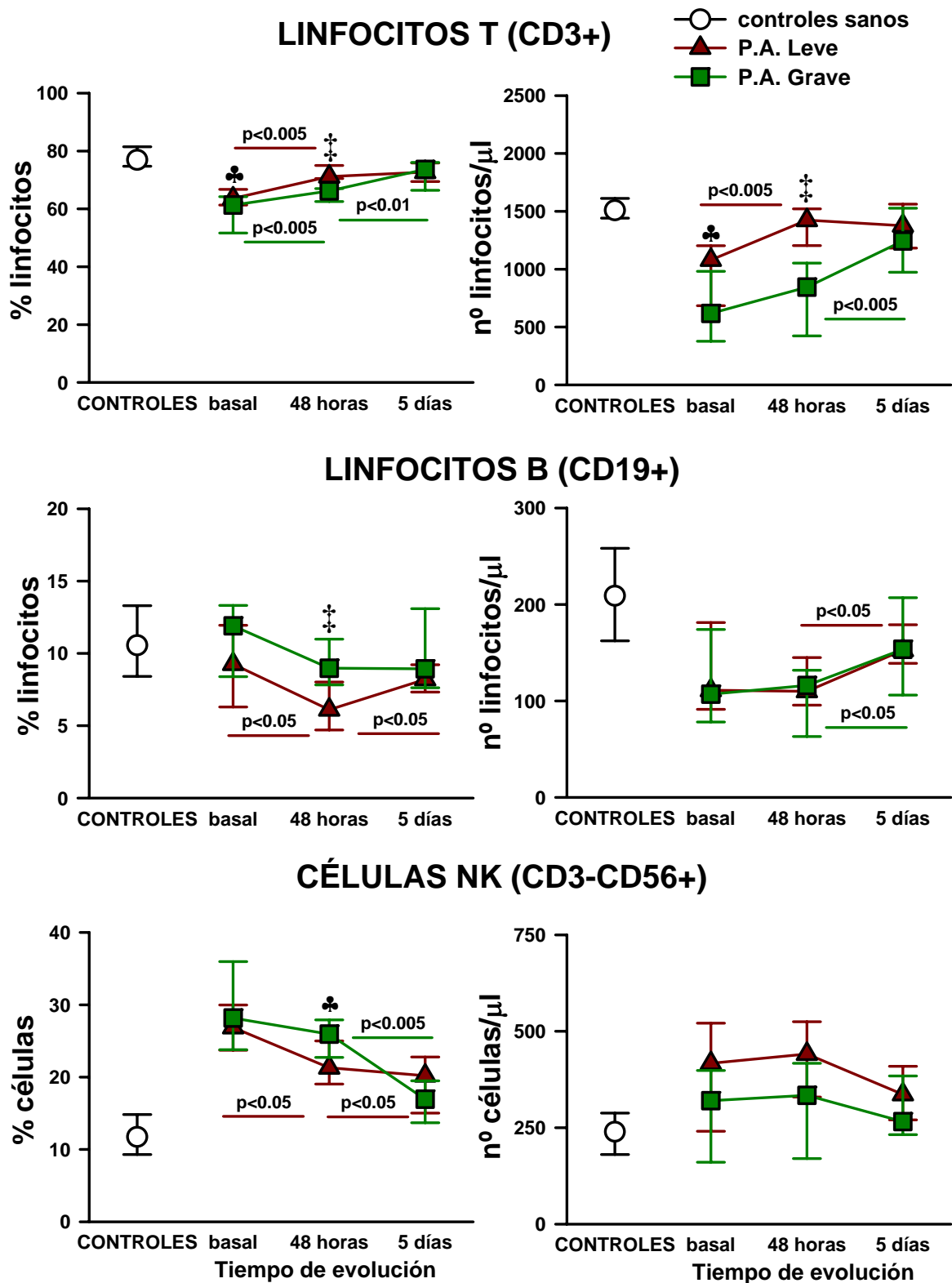


Figura 2.1: evolución del número y distribución de linfocitos T, linfocitos B y células NK en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda leve y grave durante el brote inflamatorio. Se representa la mediana y los percentiles 75 y 25.

‡ p<0.01 y ♣ p<0.05 en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG

2.2. Inversión de la distribución normal y disminución del número de células en las subpoblaciones de linfocitos T, CD3+CD4+ y CD3+CD8+.

En el momento de su admisión hospitalaria y de forma independiente del tipo evolutivo de la enfermedad se observa una disminución del porcentaje de linfocitos CD3+CD4+ y su correspondiente incremento del porcentaje de linfocitos CD3+CD8+ respecto a controles sanos ($p < 0.001$). Durante el seguimiento se reduce el porcentaje de CD3+CD4+ y se incrementa el de CD3+CD8+ de forma progresiva hasta alcanzar niveles superiores e inferiores a los de los controles sanos al 5° día ($p < 0.005$), respectivamente. No se observan diferencias significativas cuando comparamos ambos grupos de pacientes, PAL y PAG (Tabla 2.2.1).

Tabla 2.2.1: Porcentaje (%) respecto al total de linfocitos T CD3+ de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25- percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución				
			basal	48 horas	5 días		
CD3+CD4+	67.48 (63.96-70.95)	PAL	62.02 ^a (56.51-65.54)	$p < 0.005$	68.73 (64.71-72.36)	$p < 0.05$	72.15 ^a (69.33-75.90)
		PAG	63.28 ^a (59.95-67.35)	$p < 0.005$	72.62 ^b (65.55-75.77)	$p < 0.05$	76.81 ^a (70.72-81.54)
CD3+CD8+	32.52 (29.05-36.04)	PAL	37.98 ^a (34.46-43.49)	$p < 0.005$	31.27 (27.64-35.29)	$p < 0.05$	27.85 ^a (24.10-30.67)
		PAG	36.72 ^a (32.65-40.05)	$p < 0.01$	27.38 ^b (24.23-34.45)	$p < 0.05$	23.19 ^a (18.46-29.28)

^a $p < 0.005$ y ^b $p < 0.05$ diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

En consonancia con la linfopenia de linfocitos CD3+ observada en estos pacientes, el estudio del número absoluto de células reveló su disminución con respecto a los valores normales de ambas subpoblaciones tanto en pacientes con PAL como en aquellos con PAG al inicio del brote ($p < 0.001$). Al analizar la cinética de estas células se observó que mientras que los valores de linfocitos CD3+CD4+ se normalizaron con la evolución del brote, a las 48h en los pacientes que padecieron la forma leve de la enfermedad y a los 5 días en aquellos desarrollaron la forma grave, el número de linfocitos CD3+CD8+ no experimentó cambios en ninguno de los dos grupos estudiados. El número de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ es

menor en pacientes con PAG respecto de pacientes con PAL durante el periodo estudiado pero los valores tienden a equipararse al 5° día (Tabla 2.2.2.).

Tabla 2.2.2: Número linfocitos T (células/μl) CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución			
			basal	48 horas	5 días	
CD3+CD4+	1019 (942-1124)	PAL	641 ^a (416-711)	p<0.005	991 (831-1088)	1029 (830-1117)
		PAG	369 ^a (239-628)		603 ^{a,d} (294-794)	p<0.005
CD3+CD8+	513 (457-554)	PAL	400 ^a (234-484)		397 ^a (327-500)	376 ^b (272-564)
		PAG	212 ^{a,d} (142-400)		227 ^{a,c} (94-333)	296 ^a (195-394)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

3. Estudio de las poblaciones naïve y memoria/efectora en linfocitos T.

3.1. Predominancia de la subpoblación memoria/efectora sobre la naïve en linfocitos T CD4+ y CD8+.

El estudio de las isoformas CD45RA y CD45RO, que caracterizan a la subpoblación naïve y memoria/efectora respectivamente mostró un incremento del cociente RO/RA, en pacientes respecto a controles sanos, en el momento de la admisión hospitalaria independientemente del diagnóstico de gravedad. Durante la evolución del brote el cociente RO/RA disminuye en pacientes PAL y aumenta en PAG de forma transitoria a las 48 horas, aunque la predominancia de la subpoblación memoria/efectora sobre la naïve se mantiene.

La expresión CD45RO en linfocitos T CD4+ mostró un incremento significativo respecto a controles sanos durante todo el brote inflamatorio en ambos grupos de pacientes, PAL y PAG. Pero mientras que en las pacientes PAL la expresión de CD45RO sufrió un descenso significativo a las 48 horas de iniciado el brote para recuperar los niveles basales a los 5 días, en los pacientes PAG el pico de expresión a las 48 horas fue inverso produciéndose

un descenso a las 48 horas y recuperando los niveles basales al incrementarse la expresión al 5° día. La comparación entre ambas formas de pancreatitis reveló niveles superiores de CD45RO en pacientes con PAL respecto a PAG al inicio del brote y tras 5 días de evolución, mientras que a las 48 horas la relación se invierte debido al patrón inverso observado durante el brote (Tabla 3.1.1).

Respecto a la expresión de CD45RO por los linfocitos T CD8+, de nuevo se observa un incremento basal respecto a controles sanos tanto en pacientes PAL como en pacientes PAG y un patrón diferente entre ellos durante el brote. Los pacientes que padecían la forma leve mantuvieron niveles superiores a controles durante el brote mientras que aquellos diagnosticados de la forma grave, tras un ligero incremento a las 48 horas, disminuyeron la expresión de CD45RO al 5° día normalizando los niveles. Aunque los niveles de expresión de CD45RO en pacientes PAL se mantuvieron ligeramente por encima de los pacientes PAG desde el inicio del brote, únicamente al 5° día se produjo un incremento significativo (Tabla 3.1.1).

Tabla 3.1.1: Porcentaje (%) de expresión de CD45RA y CD45RO en linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución				
			basal	48 horas	5 días		
CD4+CD45RA+	52.72 (46.96-58.66)	PAL	36.66 ^a (32.01-38.82)	p<0.05	43.76 ^{b,c} (41.41-48.66)	p<0.05	35.91 ^a (32.81-38.60)
		PAG	44.70 ^{a,c} (42.00-49.36)	p<0.005	33.82 ^a (27.68-35.63)	p<0.005	42.44 ^{a,c} (38.72-49.03)
CD8+CD45RA+	73.59 (70.75-76.57)	PAL	63.77 ^a (57.08-68.97)		65.32 ^a (56.91-67.17)		64.04 ^a (62.89-68.85)
		PAG	68.62 ^a (66.26-69.53)		65.98 ^a (64.28-67.62)	p<0.05	72.18 ^{b,c} (66.53-74.59)
CD4+CD45RO+	47.28 (41.34-53.04)	PAL	63.34 ^{a,c} (61.18-68.00)	p<0.05	56.25 ^b (51.34-58.59)	p<0.05	64.09 ^a (61.40-67.19)
		PAG	55.30 ^a (50.64-58.00)	p<0.005	66.18 ^{a,c} (64.37-72.32)	p<0.005	57.56 ^{a,c} (50.97-61.28)
CD8+CD45RO+	26.41 (23.43-29.25)	PAL	36.23 ^a (31.03-42.92)		34.69 ^a (32.83-43.09)		35.96 ^{a,c} (31.15-37.11)
		PAG	31.38 ^a (30.47-33.74)		34.02 ^a (32.38-35.72)	p<0.05	27.82 ^b (25.42-33.48)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

3.2. Disminución del número absoluto de linfocitos T CD4+ y CD8+ naïve y memoria/efectores y valores superiores en PAL respecto a PAG.

Aunque el estudio de la distribución de estas poblaciones en linfocitos CD4+ revele una predominancia de la subpoblación memoria/efectora sobre la subpoblación naïve, la linfopenia característica de estos pacientes afecta al número de linfocitos CD4+CD45RO+ y CD4+CD45RA+. En el momento de la admisión hospitalaria, se observa en ambos grupos de pacientes una disminución significativa tanto de linfocitos CD4+CD45RO+ como de CD4+CD45RA+ respecto a controles sanos, pero mientras que la población memoria/efectora aumenta progresivamente alcanzando el rango control al 5° día, el número de linfocitos naïve experimenta un incremento puntual a las 48 horas (valores significativos respecto a tiempo basal y pacientes PAG) en pacientes PAL, y a los 5 días en pacientes PAG sin alcanzar la normalización (Tabla 3.2.1.).

Tabla 3.2.1: Número de linfocitos T CD4+CD45RA+ y CD4+CD45RO+ (células/ μ l) y de linfocitos T CD8+CD45RA+ y CD8+CD45RO+ (células/ μ l) en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CD4+CD45RA+	598 (488-682)	PAL	167 ^a (95-245)	P<0.05 411 ^{a,d} (229-510)	333 ^a (215-392)
		PAG	202 ^a (100-260)	184 ^a (82-245)	p<0.005 427 ^a (327-457)
CD8+CD45RA+	383 (342-434)	PAL	193 ^a (131-250)	P<0.05 215 ^{a,d} (173-329)	175 ^a (124-332)
		PAG	175 ^a (97-260)	P<0.05 154 ^a (58-202)	197 ^a (137-276)
CD4+CD45RO+	513 (455-594)	PAL	333 ^a (186-419)	P<0.05 453 (338-540)	p<0.05 558 (460-654)
		PAG	238 ^a (117-415)	P<0.05 384 ^b (199-581)	p<0.005 518 (383-747)
CD8+CD45RO+	134 ^a (111-159)	PAL	90 (64-190)	136 ^d (105-158)	97 (54-198)
		PAG	60 ^b (42-158)	69 ^a (31-138)	81 ^a (53-117)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

El estudio previo del número de linfocitos T CD3+CD8+ circulantes reveló una marcada linfopenia al inicio y durante el brote en estos pacientes en ambas formas evolutivas. Sin embargo, el número de linfocitos CD8+CD45RO+ en pacientes con PAL se mantuvo dentro del rango control durante todo el tiempo de seguimiento, mientras que los resultados obtenidos en los pacientes con PAG fueron similares a los observados en la población CD3+CD8+, con una disminución del número de linfocitos CD8+CD45RO+ respecto a controles sanos y pacientes con PAL (valores significativos a las 48h) sin cambios significativos en la evolución. Por otro lado el comportamiento de los linfocitos CD8+CD45RA+ fue similar al observado en la población CD4+CD45RA+, valores inferiores a controles sanos al inicio y durante el brote, con un incremento puntual a las 48 horas de evolución (valores significativos respecto a tiempo basal) en ambos grupos de pacientes y valores superiores en pacientes leves respecto a graves en este punto (**Tabla 3.2.1**).

4. Moléculas coestimuladoras en linfocitos T

4.1. Disminución de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4+ y CD8+, y marcada linfopenia de linfocitos CD4+CD28+ y CD8+CD28+ en ambos grupos de pacientes y de linfocitos CD8+CD28- en pacientes con PAL.

Las moléculas coestimuladoras inducen la segunda señal de activación lo cual es fundamental para inducir la proliferación de las células y la expresión de los marcadores necesarios para ejecutar su función. Una pérdida de esta señalización podría inducir un estado de anergia o no respuesta, no obstante la ausencia de expresión de CD28 en linfocitos T CD4+ se ha asociado recientemente con una posible función supresora.

Los pacientes con PA mostraron una disminución de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4+ y CD8+ al inicio del brote inflamatorio respecto a controles sanos. Los enfermos que presentaban la forma más grave de la enfermedad normalizaron la expresión de esta molécula a las 48 horas en linfocitos T CD4+ pero no en linfocitos T CD8+ pese al incremento significativo respecto a valores basales. Por el contrario los pacientes que desarrollaron la forma leve mostraron un patrón inverso, normalizando la expresión de CD28 en linfocitos T CD8+ pero no en linfocitos T CD4+ pese al incremento transitorio a las 48 horas (**Tabla 4.1.1**).

En concordancia con la linfopenia tanto de linfocitos CD4+ como de los CD8+ observada en estos pacientes, encontramos un marcado descenso del número de linfocitos T CD4+CD28+ y CD8+CD28+ respecto a controles sanos al inicio del brote, independientemente

de la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, no se observa variación, respecto a valores control, en el número de linfocitos CD4+CD28- y CD8+CD28-, con excepción de un significativo descenso del número de estos últimos en pacientes con PAL. Con la evolución del brote, se produce un incremento progresivo del número de linfocitos CD4+CD28+ y uno puntual de los linfocitos CD8+CD28+ (a las 48 horas en PAL y al 5° día en PAG), aunque únicamente los pacientes PAG normalizan los valores de CD4+CD28+ al 5° día (**Tabla 4.2.1**).

4.2. Incremento de la expresión de CD152 en linfocitos T CD4+ y modulación de la expresión en linfocitos T CD8+ en función de la gravedad de la enfermedad.

Se analizó también la expresión de CD152 (CTLA-4), relacionada con la transducción de señales supresoras a la célula. Se observa un incremento de la expresión de CD152 en linfocitos T CD4+, respecto a controles sanos, en el momento de la admisión hospitalaria y a lo largo del brote. No se produjeron diferencias entre ambos grupos de pacientes ni modulación en la expresión con la evolución del brote, con excepción de un descenso transitorio de sus niveles en pacientes PAG a las 48 horas del inicio del brote. La expresión de CD152 en linfocitos T CD8+ siguió un patrón inverso en ambos grupos de pacientes, mientras que los pacientes con PAL partieron de valores basales normales y experimentaron un marcado incremento en la expresión a las 48 horas (respecto a controles sanos y pacientes con PAG) para disminuir de nuevo al 5° día al rango control, los pacientes con PAG mostraron valores iniciales incrementados respecto a valores control, normalizaron los niveles a las 48 horas y volvieron a incrementarlos al 5° día (**Tabla 4.1.1**).

El número de linfocitos CD4+CD152+ y CD8+CD152+ en estos pacientes apenas mostró diferencias respecto a los valores control durante el periodo evolutivo estudiado, con excepción de un descenso transitorio de CD8+CD152+ a las 48 horas y un incremento de CD4+CD152+ al 5° día en pacientes diagnosticados de la forma grave. Cabe destacar el incremento significativo de ambas subpoblaciones en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG a las 48 horas de evolución (**Tabla 4.2.1**).

4.3. Incremento de la expresión de CD154 en linfocitos T CD3+ sin modulación durante la evolución del brote.

El estudio de la expresión de CD154 (CD40L), ligando de la molécula costimuladora CD40 expresada por monocitos, reveló datos similares a los observados en el estudio de CD152, tanto en lo que respecta al porcentaje expresado como al número de células. Ambos grupos de pacientes mostraron un incremento de la expresión de CD154 en linfocitos T CD3+,

respecto a controles sanos, al inicio del brote sin variaciones con la evolución (Tabla 4.1.1.). Así mismo, el número de linfocitos CD3+CD154+ se mantuvo dentro del rango control sin diferencias en función de la gravedad de la enfermedad ni variaciones en el tiempo (Tabla 4.2.1.).

Tabla 4.1.1: Porcentaje (%) de expresión de moléculas coestimuladoras respecto al total de linfocitos T CD4+, T CD8+ y T CD3+ respectivamente, en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días
CD4+CD28+	97.09 (96.36-97.75)	PAL	92.40 ^a (90.10-94.49)	p<0.05 95.58 ^b (95.95-96.92)	p<0.05 93.48 ^{a,c} (91.91-94.38)
		PAG	93.06 ^a (91.25-94.41)	p<0.005 96.64 (95.02-97.85)	p<0.01 98.10 ^b (96.89-98.68)
CD4+CD28-	2.97 (2.25-3.65)	PAL	7.60 ^a (5.52-9.90)	p<0.05 4.42 ^b (3.08-4.55)	p<0.05 6.53 ^{a,c} (5.62-8.09)
		PAG	6.94 ^a (5.59-8.75)	p<0.005 3.36 (2.15-4.98)	p<0.01 1.90 ^b (1.32-3.12)
CD8+CD28+	70.43 (65.15-77.10)	PAL	67.99 ^a (54.51-70.08)	p<0.05 71.45 (67.73-73.96)	67.86 (59.63-75.67)
		PAG	41.15 ^{a,c} (38.66-42.20)	p<0.005 48.65 ^{a,c} (42.22-53.77)	50.29 ^{a,c} (46.75-58.32)
CD8+CD28-	30.14 (22.90-35.08)	PAL	32.01 ^a (29.92-45.50)	p<0.05 28.55 (26.04-32.27)	32.14 (24.33-40.37)
		PAG	58.85 ^{a,c} (57.80-61.14)	p<0.005 51.35 ^{a,c} (46.23-57.78)	49.71 ^{a,c} (41.68-53.25)
CD4+CD152+	0.80 (0.57-1.13)	PAL	1.73 ^b (1.24-2.61)	1.74 ^a (1.32-2.55)	1.72 ^b (1.50-2.29)
		PAG	1.72 ^a (1.29-3.02)	1.44 ^a (1.22-1.74)	1.63 ^a (1.46-2.11)
CD8+CD152+	2.70 (1.63-4.72)	PAL	3.02 (2.39-5.26)	6.82 ^{a,d} (4.31-8.03)	4.31 (2.52-5.77)
		PAG	4.12 ^b (3.11-6.31)	3.64 (2.50-5.41)	p<0.005 5.60 ^a (5.36-9.29)
CD3+CD154+	1.00 (0.79-1.24)	PAL	1.49 ^a (1.24-2.46)	1.94 ^a (1.30-2.64)	1.14 (0.96-1.78)
		PAG	1.77 ^a (1.46-1.89)	1.67 ^a (1.29-2.02)	1.44 ^b (0.88-1.80)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.05 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Tabla 4.2.1: Número de linfocitos T (células/ μ l) CD4+CD28+/CD28-/CD152, linfocitos CD8+CD28+/CD28-/CD152 y CD3+CD154+ en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución			
			Basal	48 horas	5 días	
CD4+CD28+	1084 (985-1204)	PAL	473 ^a (261-602)	p<0.05	793 ^b (531-1055)	822 ^a (632-1003)
		PAG	421 ^a (220-640)		563 ^a (277-798)	864 (683-1218)
CD4+CD28-	34 (25-41)	PAL	43 (17-59)		34 (19-41)	57 ^{a,c} (41-87)
		PAG	27 (13-44)	p<0.005	19 ^b (6-32)	19 ^a (11-33)
CD8+CD28+	362 (326-401)	PAL	193 ^a (109-306)	p<0.05	234 ^b (186-343)	176 ^b (107-406)
		PAG	101 ^a (58-184)		99 ^{a,c} (47-1579)	158 ^a (89-186)
CD8+CD28-	161 (110-191)	PAL	93 ^b (86-135)		97 ^b (89-108)	110 ^b (60-125)
		PAG	133 (80-254)	p<0.05	117 (43-181)	123 (105-184)
CD4+CD152+	9 (7-17)	PAL	8 (7-9)	p<0.05	16 ^d (9-23)	15 (9-17)
		PAG	9 (8-10)		9 (6-11)	16 ^b (14-24)
CD8+CD152+	14 (10-19)	PAL	11 (10-13)		28 ^d (9-36)	10 (8-12)
		PAG	11 (10-16)	p<0.05	8 ^b (5-11)	16 ^c (14-21)
CD3+CD154+	16 (13-19)	PAL	13 (9-14)	p<0.05	23 (12-37)	17 (8-20)
		PAG	11 (5-18)		15 (8-19)	15 (11-25)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

5. Marcadores de activación en linfocitos T y linfocitos B

5.1. Incremento de la expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ y disminución del número de linfocitos T CD4+CD25+, CD4+CD122+, CD4+CD71+ y CD4+CD69+.

Los linfocitos T CD4+ de pacientes con PA, independientemente de la forma evolutiva, mostraron un incremento significativo de CD25, respecto a controles sanos que se

mantuvo a lo largo del seguimiento. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la expresión de CD122, CD69 y CD71 por esta subpoblación, respecto a valores control, en los tiempos estudiados. La excepción la constituye un ligero incremento de CD71 al inicio del brote y de CD122 a las 48 horas de evolución en pacientes PAG, que se normalizaron a las 48 horas y al 5° día respectivamente. Se encontraron ligeras diferencias puntuales a las 48 horas de evolución del brote entre ambos grupos de pacientes, un incremento en la expresión de CD69 y CD71 en pacientes PAL respecto a PAG, y de CD25 en pacientes PAG respecto a PAL (**Tabla 5.1.1**).

De forma similar a lo encontrado en las subpoblaciones previamente estudiadas, la linfopenia característica de estos pacientes se refleja en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ activados. Se observa una disminución de linfocitos CD4+CD25+, CD4+CD122+, CD4+CD69+ y CD4+CD71+ al inicio del brote respecto a controles sanos en ambos grupos de pacientes, con excepción de la subpoblación CD4+CD25+ en enfermos con PAG que no muestra cambios. Con la evolución del brote, los pacientes con PAG recuperan progresivamente los niveles normales en todas las subpoblaciones mientras que los que presentan PAL normalizan los niveles de CD4+CD25+ y CD4+CD69+, al 5° día y a las 48h respectivamente, pero mantienen niveles de CD4+CD122+ y CD4+CD71+ por debajo del rango control al 5° día, tras una transitoria normalización a las 48 horas. De nuevo las diferencias entre grupos tienen lugar a las 48 horas de evolución con un incremento en el número de CD4+CD122+, CD4+CD69+ y CD4+CD71+ en pacientes padecen la forma leve respecto de aquellos que sufren la forma grave (**Tabla 5.1.1**).

5.2. Aumento del porcentaje y el número de linfocitos T CD8+CD25+, CD8+CD69+ y CD8+CD71+ en linfocitos T CD8+ en PAL respecto a PAG

En el momento de la admisión hospitalaria, únicamente la expresión de CD69 por linfocitos T CD8+ mostró un incremento significativo respecto a controles sanos en ambos grupos de pacientes estudiados, los niveles no disminuyeron con la evolución del brote sino que incluso aumentaron al 5° día respecto a valores basales en los pacientes con la forma grave de la enfermedad. Tras 48 horas de evolución, los linfocitos T CD8+ de pacientes con PAL experimentaron un incremento significativo del resto de marcadores de activación, CD25, CD122, CD71, este aumento fue de carácter transitorio y retornó a los valores control al 5° día en el caso de CD25 y CD71. Los linfocitos T CD8+ de pacientes con PAG, sin embargo, solo incrementaron la expresión de CD122 a las 48 horas de evolución. (**Tabla.5.2.1**).

Tabla 5.1.1.: Distribución y número de linfocitos T CD4+ que expresan CD25, CD122, CD71 y CD69 en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días
CD4+CD25+	3.94 (3.15-5.75)	PAL	6.72 ^a (6.36-8.83)	7.49 ^a (6.75-8.37)	6.84 ^a (4.30-8.90)
		PAG	8.24 ^a (6.58-10.73)	8.74 ^{a,d} (8.36-10.13)	6.73 ^a (5.61-8.36)
CD4+CD122+	1.52 (1.23-1.79)	PAL	1.77 (1.63-3.74)	1.86 (1.51-2.69)	1.75 (1.13-2.85)
		PAG	1.94 (1.30-3.44)	1.99 ^b (1.53-2.66)	1.85 (0.98-2.52)
CD4+CD71+	3.38 (2.21-4.81)	PAL	3.97 (3.40-5.59)	3.72 ^d (3.27-4.09)	3.57 (2.60-4.30)
		PAG	4.66 ^b (3.45-6.35)	3.05 (1.90-3.67)	2.24 (1.96-4.70)
CD4+CD69+	1.72 (1.27-2.49)	PAL	2.21 (1.37-2.44)	2.45 ^{b,d} (2.18-2.83)	1.67 (1.37-2.30)
		PAG	2.15 (1.59-3.19)	1.77 (1.01-2.31)	1.72 (1.34-2.81)
N° de células/μl					
CD4+CD25+	45 (38-65)	PAL	37 ^b (32-44)	67 ^b (46-81)	57 (36-86)
		PAG	33 (20-56)	47 (26-82)	61 (38-81)
CD4+CD122+	17 (16-19)	PAL	9 ^b (4-17)	17 ^d (12-22)	14 ^b (12-16)
		PAG	7 ^a (6-11)	10 ^a (5-14)	14 (8-22)
CD4+CD71+	41 (28-54)	PAL	18 ^a (15-25)	31 ^d (21-44)	28 ^b (24-31)
		PAG	19 ^a (8-35)	12 ^a (6-25)	26 (20-42)
CD4+CD69+	21 (15-27)	PAL	9 ^a (7-18)	20 ^c (16-25)	15 (12-21)
		PAG	8 ^a (4-12)	8 ^a (5-14)	18 (11-29)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

El estudio comparativo de ambos grupos de pacientes reveló que los pacientes leves expresaban niveles superiores, respecto a pacientes graves, de CD25, CD69 y CD71, mientras que los pacientes graves mostraron un incremento de CD122 respecto a los leves, no obstante al 5° día de evolución las diferencias desaparecían.

Aunque estos pacientes presentan una marcada linfopenia de linfocitos T CD8+ en el momento de su admisión hospitalaria que afecta a las subpoblaciones activadas, el número de linfocitos CD8+CD25+ y CD8+CD69+ en pacientes con PAL, y CD8+CD71+ en pacientes con PAG fue similar al de controles sanos. De forma excepcional los pacientes con PAL mostraron un incremento del número de linfocitos CD8+CD25+ y CD8+CD69+ respecto a controles sanos a las 48 horas de evolución, pero la norma general fue una recuperación del número de linfocitos T CD8+ activados al 5° día de evolución, con excepción de los linfocitos CD8+CD25+ en pacientes con PAG. Las diferencias entre ambos grupos de pacientes tienen lugar a las 48 horas de evolución y desaparecen al 5° día, los pacientes con PAL muestran un número significativamente mayor de linfocitos T CD8+ activados respecto a pacientes con PAG (Tabla 5.2.2.).

Tabla 5.2.1: Porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresan CD25, CD122, CD71 y CD69 en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días
CD8+CD25+	3.63 (2.07-4.46)	PAL	4.06 ^d (3.42-5.31)	p<0.05 8.12 ^{a,c} (5.13-8.85)	P<0.05 4.57 (2.46-5.47)
		PAG	3.14 (1.66-4.46)	4.17 (3.37-5.16)	3.64 (1.56-4.78)
CD8+CD122+	4.43 (3.42-5.00)	PAL	2.95 (2.30-3.82)	p<0.05 7.05 ^a (6.51-8.66)	7.55 ^a (5.28-9.20)
		PAG	5.33 ^d (3.29-5.96)	p<0.005 8.00 ^a (6.25-8.72)	8.19 ^a (6.26-10.17)
CD8+CD71+	3.99 (2.44-5.74)	PAL	5.04 (3.88-5.52)	p<0.05 6.15 ^{a,c} (5.89-8.60)	P<0.05 4.61 (3.67-5.45)
		PAG	3.51 (2.36-5.32)	4.37 (3.49-5.26)	4.20 (3.03-6.22)
CD8+CD69+	2.40 (1.79-3.44)	PAL	6.22 ^{a,d} (4.02-7.65)	8.97 ^{a,c} (6.03-10.88)	6.56 ^a (4.62-7.35)
		PAG	4.92 ^a (2.41-6.19)	4.57 ^a (3.40-5.66)	P<0.05 6.37 ^a (4.18-7.02)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Tabla 5.2.2.: número de linfocitos T CD8+ (células/μl) que expresan CD25, CD122, CD71 y CD69 en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días
CD8+CD25+	16 (10-23)	PAL	18 (8-23)	p<0.05 28 ^{b,c} (15-42)	P<0.05 15 (4-26)
		PAG	7 ^a (4-16)	10 ^b (4-14)	8 ^a (5-11)
CD8+CD122+	20 (15-26)	PAL	12 ^b (3-15)	p<0.05 25 ^d (23-39)	23 (13-34)
		PAG	10 ^b (6-15)	15 (7-23)	19 (17-22)
CD8+CD71+	18 (12-28)	PAL	12 (10-77)	p<0.05 24 ^c (17-41)	P<0.05 12 (9-21)
		PAG	9 ^b (4-13)	10 ^b (5-159)	12 (9-19)
CD8+CD69+	11 (9-17)	PAL	19 ^{b,d} (17-21)	p<0.05 34 ^{a,c} (21-43)	18 ^b (12-24)
		PAG	11 (5-14)	10 (3-14)	P<0.05 13 (10-22)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

5.3. Incremento de la expresión de CD56 por linfocitos T CD3+ y aumento del número de linfocitos T CD3+CD56+ en PAL respecto a PAG.

Los pacientes con PA mostraron un incremento respecto a controles sanos de la expresión de CD56 por los linfocitos T CD3+ al inicio del brote inflamatorio. Durante el brote los niveles disminuyeron en ambos grupos de pacientes, pero únicamente los pacientes con PAL se equipararon a los controles sanos al 5° día. El número de linfocitos T CD3+CD56+ fue menor respecto a controles sanos, debido a la linfopenia asociada a esta patología, pero los niveles se recuperan con la evolución del brote, a las 48 horas en los pacientes leves y al 5° día en los graves. Este desfase en la recuperación genera diferencias entre ambos grupos de pacientes, con un aumento significativo del número de linfocitos T CD3+CD56+ en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG a las 48 horas de evolución (Tabla 5.3.1).

Tabla 5.3.1.: Distribución y número de linfocitos T CD3+CD56+ en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución			
			Basal	48 horas	5 días	
CD3+CD56+	8.56 (6.50-9.81)	PAL	10.42 ^a (8.14-13.12)	9.61 ^b (8.20-12.01)	P<0.05	8.10 (5.88-9.26)
			PAG	16.33 ^{a,c} (10.83-18.39)		11.01 ^a (9.88-12.72)
		Nº de células/µl				
		CD3+CD56+	128 (103-150)	PAL	114 ^b (77-134)	126 ^d (88-165)
PAG	88 ^b (66-112)			76 ^a (48-114)	p<0.005	149 ^d (105-199)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

5.4. Incremento de la molécula MHC II (HLA-DR) en linfocitos T y aumento del número de linfocitos T CD3+HLA-DR+ en PAL respecto a PAG. Linfopenia de linfocitos B CD19+HLA-DR+.

La expresión de HLA-DR por linfocitos T CD3+ de pacientes con PA al ingreso hospitalario se encontró significativo incrementada con respecto a la de los controles sanos independientemente de la forma clínica de la enfermedad. Durante el seguimiento los niveles disminuyeron progresivamente pero únicamente llegaron a normalizarse en los pacientes con PAL. Como se observa en el estudio de otros marcadores de activación, la expresión de HLA-DR en linfocitos T CD3+ se incrementó de forma transitoria en pacientes con PAL respecto a los que padecían PAG a las 48 horas de evolución. Es interesante destacar que, a pesar de la linfopenia característica de estos pacientes, el número de linfocitos T CD3+HLA-DR+ fue similar al de controles sanos en el momento de la admisión hospitalaria, y apenas experimentó cambios con la evolución del brote, con excepción de un incremento transitorio del número de linfocitos en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG y valores control a las 48 horas (Tabla 5.4.1.).

Tabla 5.4.1.: Distribución y número de linfocitos T y B que expresan MHC II en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución					
			basal	48 horas	5 días			
CD3+HLA-DR+	4.82 (3.25-6.40)	PAL	11.12 ^a (9.52-12.50)	10.83 ^{a,c} (9.82-16.11)	p<0.05	5.90 (5.16-6.43)		
			PAG	8.91 ^a (8.59-11.20)		7.14 ^a (6.22-8.05)	6.83 ^a (5.35-8.18)	
		CD19+HLA-DR+	96.37 (91.35-98.42)	PAL	97.65 (96.27-99.39)	94.41 (93.25-9.00)	p<0.05	95.50 (93.78-99.23)
					PAG	97.60 (91.75-98.88)		96.26 (93.39-97.74)
CD3+HLA-DR+	79 (53-110)	PAL	74 (54-107)	118 ^{b,d} (79-272)	p<0.05	61 (48-75)		
			PAG	67 (37-97)		62 (30-96)	82 (49-119)	
		CD19+HLA-DR+	205 (153-271)	PAL	78 ^a (40-94)	103 ^a (93-117)	p<0.05	142 ^b (99-165)
					PAG	80 ^b (73-175)		106 ^a (47-134)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Por otro lado, la expresión de HLA-DR por linfocitos B CD19+ no mostró diferencias respecto a controles sanos ni al inicio del brote ni durante la evolución del mismo. Sin embargo, el número de linfocitos B CD19+HLA-DR+ fue drásticamente inferior al observado en controles sanos, y el progresivo aumento con la evolución del brote no recupera los niveles normales. No se observan diferencias ni en la expresión del marcador ni en el número de linfocitos entre ambos grupos de pacientes (Tabla 5.4.1.).

5.5. Disminución del porcentaje y número de linfocitos T CD3+CD38+ y linfocitos B CD19+CD38+.

Tanto la expresión de CD38+ por linfocitos T CD3+ como el número de estas células CD3+CD38+ fue significativamente inferior en ambos grupos de pacientes en el momento de su admisión hospitalaria con respecto a las cifras encontradas en controles sanos. La evolución del brote inflamatorio no normalizó los valores a pesar del incremento experimentado en la expresión de CD38 en pacientes con PAL y del número de linfocitos

CD3+CD38+ en ambos grupos de pacientes. Respecto a la relación de la expresión de este marcador con la gravedad de la patología, se observa una mayor expresión y número de linfocitos en pacientes que padecieron la forma leve de la enfermedad respecto a aquellos que padecieron la forma grave, a las 48 horas de evolución del brote (**Tabla 5.5.1.**)

La expresión de CD38 por linfocitos B CD19+ en pacientes con PAG mostró un incremento significativo al inicio del brote, pero con la evolución del mismo los niveles disminuyeron drásticamente por debajo del rango control. En los pacientes con PAL su expresión fue normal al inicio y tras 48 horas de evolución del brote pero también disminuyó bruscamente al 5° día. De nuevo los diferentes patrones de expresión durante el brote generan diferencias entre ambos grupos a las 48 horas de evolución, siendo la expresión de CD38 mayor en pacientes con PAL respecto a los que presentan PAG. Por otra parte el número de linfocitos B CD19+CD38+ fue significativamente menor en los enfermos con respecto a los controles sanos al inicio y durante el brote inflamatorio. Además, no se observan diferencias entre grupos de pacientes ni cambios destacables respecto a los niveles iniciales (**Tabla 4.5.1.**)

Tabla 5.5.1: Distribución y número de linfocitos T y B que expresan CD38 en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días
CD3+CD38+	36.18 (34.73-39.80)	PAL	21.85 ^a (18.19-28.17)	26.84 ^{a,d} (22.46-33.41)	25.17 ^a (22.63-32.28)
		PAG	24.35 ^a (20.48-29.35)	20.40 ^a (14.79-25.89)	22.50 ^a (19.48-31.54)
CD19+CD38+	67.22 (60.11-69.66)	PAL	61.46 (59.25-74.79)	p<0.05 63.65 (61.36-66.78)	48.66 ^a (44.43-51.96)
		PAG	75.72 ^{a,d} (72.49-82.89)	p<0.005 53.12 ^{a,c} (41.00-55.60)	42.26 ^a (39.60-50.65)
CD3+CD38+	619 (493-774)	PAL	175 ^a (123-240)	p<0.05 353 ^a (214-475)	283 ^a (256-308)
		PAG	155 ^a (95-285)	156 ^{a,d} (64-286)	314 ^a (208-373)
CD19+CD38+	156 (96-197)	PAL	60 ^a (45-66)	74 ^a (60-78)	69 ^a (44-83)
		PAG	67 ^b (59-135)	p<0.01 56 ^a (22-78)	76 ^a (45-89)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

5.6. Incremento del porcentaje y número de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan FasL (CD95) en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL

Se observa una menor expresión de CD95 por linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con PAL con respecto a los controles al inicio del brote, mientras que en los enfermos con PAG no se observaron estas diferencias. Durante la evolución del brote los niveles se incrementaron en ambas subpoblaciones en los que presentaban PAL pero no se normalizaron hasta el quinto día en linfocitos T CD4+, en los pacientes graves no se observaron cambios con excepción de un aumento transitorio a las 48 horas en linfocitos T CD4+ para recuperar los valores control al 5° día. En contrario a lo observado con otros marcadores asociados a activación linfocitaria, la expresión de CD95 tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ fue mayor en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL al inicio y durante el brote, sin llegar a equipararse a pesar del incremento experimentado por los pacientes leves al quinto día (Tabla 5.6.1.).

Tabla 5.6.1.: Distribución y número de linfocitos T CD4+CD95+ y CD8+CD95+ en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días
%					
CD4+CD95+	22.89 (18.11-26.00)	PAL	12.85 (10.90-17.23) ^a	7.89 (7.20-11.89) ^a	17.76 (14.17-23.40)
		PAG	26.92 (19.81-32.88) ^c	33.23 (31.31-37.68) ^{a,c}	23.73 (18.60-29.33) ^d
CD8+CD95+	16.67 (15.24-19.20)	PAL	9.85 (8.91-11.18) ^a	7.65 (6.34-8.57) ^a	12.92 (9.57-13.85) ^a
		PAG	15.01 (12.76-19.81) ^c	15.12 (14.33-17.28) ^c	15.74 (13.58-21.59) ^d
N° de células/µl					
CD4+CD95+	249 (217-329)	PAL	50 (43-70) ^a	75 (63-108) ^{a,c}	150 (93-209) ^a
		PAG	110 (46-195) ^a	254 (127-298)	215 (165-312)
CD8+CD95+	77 (61-106)	PAL	13 (11-21) ^{a,d}	26 (23-32) ^{a,d}	35 (20-61) ^a
		PAG	36 (19-75) ^b	40 (35-50) ^a	44 (39-64) ^b

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

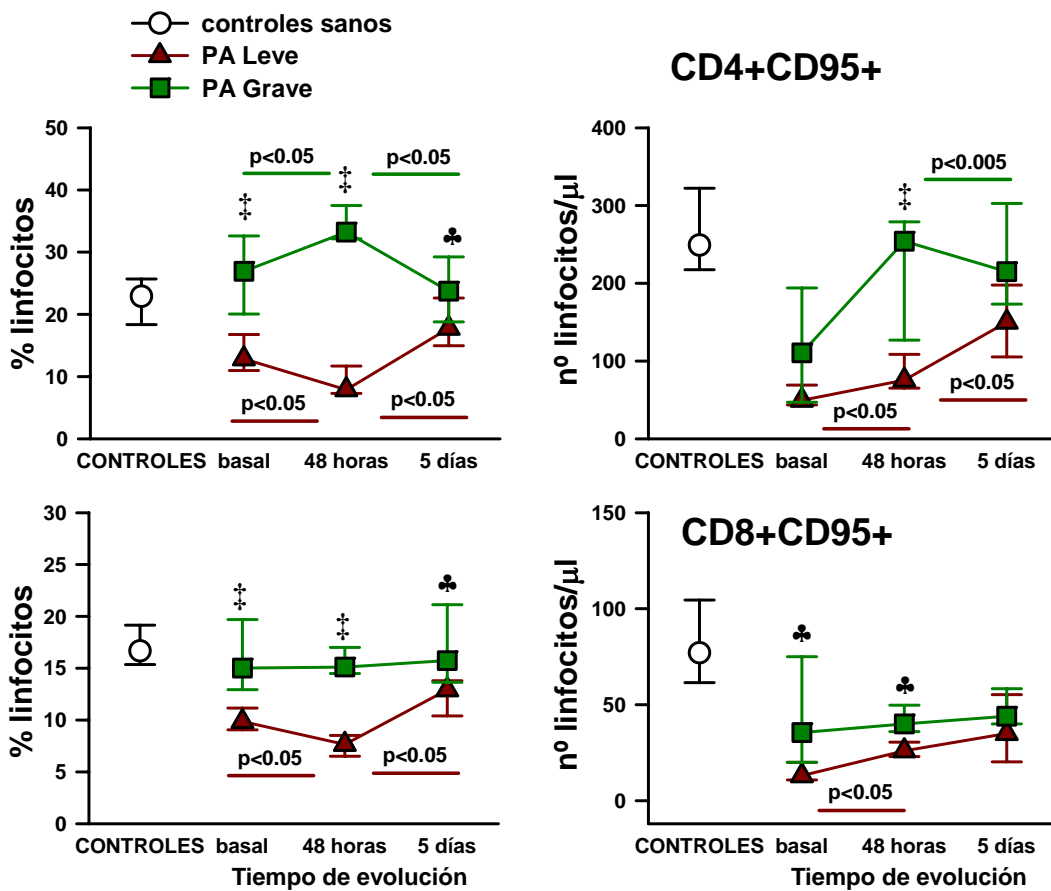
^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Cuando se estudió el número de linfocitos CD4+CD95+ y CD8+CD95+, se observa una marcada disminución en ambos grupos de pacientes respecto a controles sanos que aumenta con la evolución del brote, sin embargo solo los niveles de CD4+CD95+ en pacientes con PAG alcanzan valores control. Las diferencias observadas en el porcentaje de

expresión entre ambos grupos se redujeron a lo largo de la evolución, los pacientes con PAG mostraron mayor número de linfocitos CD4+CD95+ (al inicio y tras 48 horas) y CD8+CD95+ (48 horas) que los pacientes con PAL pero los valores se equipararon al 5º día de evolución del brote (Tabla 5.6.1. y figura 5.6.).

Figura 5.6.: evolución del número y distribución de linfocitos T que expresan FasL (CD95) en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda leve y grave durante el brote inflamatorio. Se representa la mediana y los percentiles 75 y 25.

‡ p<0.01 y ♣ p<0.05 en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG



6. Moléculas de adhesión en linfocitos T y linfocitos B

6.1. Redistribución de las subpoblaciones de linfocitos CD3+CD11a+ y marcada linfopenia de linfocitos CD3+CD11a+^{low}

Se observa una redistribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+CD11a+ en pacientes con pancreatitis aguda durante al momento del ingreso similar en ambos grupos de enfermos sin diferencias en función de la gravedad del cuadro clínico. El porcentaje de

linfocitos T CD3+CD11a^{high} estaba incrementado y el de linfocitos T CD3+CD11a^{low} descendido respecto a controles sanos al inicio del brote, tras las primeras 48 horas de evolución los resultados se invierten en ambas subpoblaciones, descendiendo y aumentándose respectivamente respecto a los valores control y a los observados en tiempo basal para permanecer sin cambios al 5° día (Tabla 6.1.1).

Tabla 6.1.1: Porcentaje (%) respecto al total de linfocitos T CD3+CD11a+ de linfocitos T CD3+CD11a^{high} y CD3+CD11a^{low} en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución			
			Basal	48 horas	5 días	
CD3+CD11a ^{high}	24.52 (21.90-26.56)	PAL	40.47 ^a (37.88-46.84)	p<0.05	33.37 ^a (26.82-34.71)	30.48 ^b (23.88-34.98)
		PAG	38.13 ^a (36.36-40.99)	p=0.001	28.26 ^b (23.99-28.99)	27.30 (23.75-34.43)
CD3+CD11a ^{low}	75.46 (73.38-78.16)	PAL	59.54 ^a (53.18-62.03)	p<0.05	66.63 ^a (65.29-73.18)	69.52 ^b (65.02-76.12)
		PAG	61.87 ^a (59.01-63.64)	p=0.001	71.19 (67.71-79.01)	72.70 (65.57-76.25)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Por otro lado la linfopenia característica de estos pacientes no afectó a la subpoblación de linfocitos CD3+CD11a^{high} de pacientes con PAL cuyo número se mantuvo dentro del rango de valores control y sin variaciones durante el brote inflamatorio, sin embargo aunque los pacientes con PAG también mostraron valores normales de esta subpoblación, sufrieron un marcado y transitorio descenso del número de linfocitos a las 48 horas respecto valores control y pacientes con PAL retornando a los iniciales al 5° día. Consecuentemente la subpoblación relacionada con el número bajo de linfocitos circulantes en estos pacientes fue la CD3+CD11a^{low} cuyo número fue drásticamente inferior respecto a controles sanos en el momento de su admisión hospitalaria en ambos grupos de enfermos. Durante el episodio inflamatorio su número se incrementa pero sin llegar a normalizarse, los pacientes con PAG experimentan un incremento a las 48 horas respecto a los valores basales sin sufrir cambios posteriores mientras que en los que presenta PAG el incremento es progresivo (Tabla 6.1.2).

Tabla 6.1.2: Número linfocitos T (células/ μ l) CD3+CD11a^{high} y CD3+CD11a^{low} en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CD3+CD11a ^{high}	399 (336-485)	PAL	305 (202-430)	356 (262-513)	354 (195-457)
		PAG	236 (128-483)	173 ^{a,d} (100-312)	346 (223-479)
CD3+CD11a ^{low}	1242 (1091-1343)	PAL	495 ^a (253-616)	863 ^a (567-1015)	807 ^a (603-976)
		PAG	401 ^a (221-623)	641 ^a (266-869)	866 ^a (693-1129)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

6.2. Disminución de la expresión de CD11a en linfocitos B CD19+ con la evolución del brote, y grave linfopenia de linfocitos CD19+CD11a+.

La expresión de CD11a por los linfocitos B CD19+ de pacientes con PA sigue un patrón similar durante el episodio inflamatorio sin diferencias en función de la gravedad de la enfermedad. Ambos grupos de pacientes estudiados mostraron niveles de expresión similares a los observados en controles sanos a comienzos del brote que disminuyeron progresivamente respecto a valores los normales. Sin embargo, y debido probablemente a la linfopenia asociada a estos pacientes, el número de linfocitos CD19+CD11a+ fue marcadamente inferior respecto a controles sanos desde el momento del ingreso y durante los primeros 5 días. Tanto los pacientes leves como los graves sufrieron leves fluctuaciones no significativas del número de linfocitos CD19+CD11a+, un progresivo incremento en pacientes con PAL, y un descenso transitorio a las 48 horas de evolución del brote en pacientes con PAG para retornan a los valores basales al 5° día (Tabla 6.2.1.)

Tabla 6.2.1.: Distribución y número de linfocitos T CD19+CD11a+ en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución				
			basal	48 horas	5 días		
CD19+CD11a+	96.53 (92.50-98.10)	PAL	95.50 (92.21-97.11)	p<0.05	91.79 ^b (84.66-96.42)	87.94 ^a (83.40-94.69)	
			PAG	95.44 (88.93-97.98)		93.19 ^b (87.39-94.49)	91.56 ^a (84.33-95.44)
					p<0.05		
					N° de células/μl		
CD19+CD11a+	205 (164-269)	PAL	99 ^a (78-138)		103 ^a (91-146)	133 ^a (111-147)	
		PAG	90 ^a (72-162)		103 ^a (45-127)	144 ^a (97-170)	

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos. “p” (Test de Wilcoxon)

6.3. Incremento de la expresión de CD11b+ en linfocitos T CD3+ y disminución de linfocitos CD3+CD11b+ en pacientes con PAG. Disminución de la expresión de CD11b en linfocitos B CD19+ y marcada linfopenia de linfocitos CD19+CD11b+.

Los pacientes mostraron un marcado incremento del porcentaje de CD11b en linfocitos T CD3+ al inicio del brote respecto a controles sanos (p<0.005) siendo mayor el porcentaje en pacientes con PAG respecto a aquellos con pronóstico leve. La progresión en el tiempo del brote inflamatorio no produjo cambios en la expresión de esta molécula en pacientes con PAL pero sí redujo los niveles en pacientes con PAG aunque sin alcanzar los valores control. Como se observa en la subpoblación de linfocitos T CD3+CD11a+^{high}, los pacientes con PAL mostraron un número de linfocitos CD3+CD11b+ dentro del rango control durante todo el brote inflamatorio, con un discreto incremento respecto a los iniciales al 5° día, mientras que el número de linfocitos que expresaron esta integrina en los pacientes que padecían la forma grave fue sensiblemente inferior a los observados en controles sanos (p<0.005) normalizándose a las 48 horas del brote (Tabla 6.3.1.).

Por otro lado la expresión de CD11b en linfocitos B CD19+ de estos pacientes en el momento de su admisión hospitalaria fue inferior a la expresada por los de los controles sanos (p<0.01) independientemente de la gravedad de la enfermedad, aunque los niveles de pacientes con PAL fueron levemente superiores a los de PAG. La expresión se normalizó en ambos grupos de pacientes a las 48 horas de evolución del brote, pero en los pacientes con PAG la

normalización fue transitoria y se produjo un nuevo descenso de la expresión de CD11b al 5° día ($p < 0.05$). La linfopenia observada en estos pacientes a comienzos de la fase aguda inflamatoria afecta al número de linfocitos CD19+CD11b+ circulantes, los valores son drásticamente inferiores a los encontrados en controles sanos sin diferencias entre las dos formas evolutivas de la enfermedad ($p < 0.001$), y aunque los valores se incrementan con la evolución, al finalizar el seguimiento no se equiparan a los valores control ($p < 0.05$ en PAL y $p < 0.01$ en PAG) (Tabla 6.3.1.).

Tabla 6.3.1.: Distribución y número de linfocitos T CD3+CD11b+ y linfocitos B CD19+CD11b+ en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CD3+CD11b+	16.23 (13.25-17.69)	PAL	19.47 ^a (16.70-28.73)	24.27 ^a (19.29-28.70)	25.44 ^a (18.66-29.41)
		PAG	27.44 ^{a,d} (23.71-30.42)	24.76 ^a (23.27-26.07)	23.50 ^a (17.05-28.52)
CD19+CD11b+	45.64 (42.34-49.12)	PAL	41.96 ^b (35.01-45.54)	$p=0.05$ 46.38 (41.83-49.93)	44.00 (42.74-49.67)
		PAG	39.95 ^{a,d} (31.62-40.67)	$p<0.005$ 42.83 (39.52-48.17)	$p<0.05$ 39.66 ^{b,d} (33.33-47.24)
N° de células/ μ l					
CD3+CD11b+	249 (212-288)	PAL	169 ^a (149-205)	$p<0.05$ 258 (218-349)	348 (195-441)
		PAG	153 (91-339)	212 (90-283)	$p<0.05$ 253 (170-447)
CD19+CD11b+	87 (69-119)	PAL	44 ^a (37-68)	47 ^a (41-64)	$p<0.05$ 70 ^b (61-88)
		PAG	37 ^a (25-72)	51 ^a (21-64)	60 ^b (50-79)

^a $p < 0.005$ y ^b $p < 0.05$ diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^d $p < 0.05$ diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

7. Expresión de quimiorreceptores en las principales poblaciones linfocitarias. Estudio de las posibles variaciones en los niveles de expresión en relación con el grado de activación en linfocitos T y linfocitos B.

7.1. Incremento de la expresión de quimiorreceptores (CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR4) en linfocitos T CD3+, linfocitos B CD19+ y células NK CD3-CD56+, y diferencias en el número de linfocitos en función del quimiorreceptor expresado y la gravedad de la pancreatitis.

En el momento de la admisión hospitalaria los pacientes mostraron un incremento de la expresión de quimiorreceptores (QRs) por *linfocitos T* CD3+ respecto a valores control, con excepción de la de CCR6 en pacientes con PAG que fue similar a la observada en controles sanos. Con la evolución del brote se observa una disminución generalizada de la expresión de QRs sin equipararse a valores control, aunque sus patrones a las 48 horas y 5 días, varían en función del quimiorreceptor y la gravedad de la enfermedad. Como excepción a esta regla se observa un aumento de la expresión de CCR6 y CXCR3 en pacientes con PAG. Los linfocitos T de pacientes con PAG expresaron niveles mayores de CCR2, CCR5 y CXCR4 respecto a pacientes con PAL mientras que los de CCR6 y CXCR3 fue mayor en los pacientes leves respecto a los graves, los niveles de expresión de CCR2, CCR5 y CCR6 se igualaron al 5º día de evolución. El *número de linfocitos T* que expresan QRs fue superior en pacientes respecto a controles sanos al inicio del brote. La excepción a la regla fue una disminución del número de linfocitos CD3+CCR6+ en ambos grupos de pacientes, y de CD3+CXCR3+ en enfermos con PAG con respecto a controles sanos. Con la evolución del brote se produjo un aumento del número de linfocitos pero únicamente el número de CD3+CCR6+ se normalizó en pacientes PAL al quinto día, en enfermos con PAG el incremento tiende a producirse al 5º día mientras que en los leves se observa aumentos progresivos del número de linfocitos que expresan CCR2, CXCR3 y CXCR4, y un aumento puntual a las 48 horas de linfocitos CCR5+ y CCR6+. El número de linfocitos que expresan QRs fue mayor en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG, observándose las mayores diferencias a las 48 horas. Únicamente el número de linfocitos que expresan CCR2, CCR5 y CCR6 se equipararon al quinto día de evolución entre ambos grupos de pacientes (**Tabla 7.1.1. y figura 7.1.1.**).

De forma similar a lo encontrado en la población T, la expresión de QRs en *linfocitos B* CD19+ mostró un incremento generalizado en pacientes respecto a controles sanos al inicio del brote, con excepción de la expresión de CCR6 que disminuyó en pacientes con PAL y no

mostró diferencias en pacientes con PAG. Durante la evolución del brote la pauta más frecuente fue la disminución de la expresión de QRs, con fluctuaciones a las 48 horas. Los niveles de expresión en pacientes no alcanzaron los valores control, con excepción de la de CCR6 que se normalizó en pacientes con PAG a las 48 horas. La expresión de CCR2, CCR5 y CXCR4 fue mayor en pacientes leves respecto a pacientes graves, mientras que la de CCR6 y CXCR3 fue superior en estos últimos respecto a los primeros, solo los niveles de CCR5 y CXCR3 se equipararon al 5° día de evolución. El **número de linfocitos B** CD19+ que expresan QRs fue, sin embargo, menor en pacientes respecto a controles sanos al inicio del brote, particularmente en pacientes leves; en los pacientes con PAG apenas se observaron cambios, con excepción de un descenso del número de linfocitos CD19+CCR5+ y CD19+CCR6+, mientras que el de linfocitos CD19+CXCR2+ y CD19+CXCR4+ mostró un incremento en pacientes con PAL. Ambos grupos de pacientes mostraron un incremento del número de linfocitos al 5° día de evolución del brote, con descensos puntuales a las 48 horas, pero no se alcanzaron los valores control, con excepción de linfocitos CD19+CXCR3+ en pacientes con PAL. Se observan diferencias menores al inicio del brote entre ambos grupos excepto un incremento del número de CD19+CCR5+ en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG que se igualó al 5° día. (**Tabla 7.1.1. y figura 7.1.1.**)

No se observan diferencias destacables en la expresión de QRs por **células NK** CD3-CD56+ en pacientes respecto controles en el momento de la admisión hospitalaria, pero con la evolución del brote, tras las previamente descritas fluctuaciones a las 48 horas, se produce un incremento neto de la expresión de QRs al 5° día, especialmente en pacientes con PAL. Las diferencias entre pacientes son más acusadas las 48 horas de evolución del brote, con un incremento de CCR2 y CXCR4 en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG y de CCR5 en pacientes leves respecto a graves. El **número de células NK** que expresan QRs es mayor en pacientes respecto a controles al inicio del brote, con excepción de las que expresan CCR6 y CXCR3 en enfermos con PAG que se mantienen en niveles normales. La modulación durante el brote es diferente en función del QR y la gravedad de la enfermedad, pero el resultado general al 5° día es un marcado incremento del número de linfocitos que expresan QRs respecto al observado en controles sanos. Las diferencias entre ambos grupos de pacientes son muy puntuales y aparecen con la evolución del brote, se observa un incremento de células CD3-CD56+CCR5+ a las 48 horas, y de CD3-CD56+CCR6+ y CD3-CD56+CXCR4+ en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG (**Tabla 7.1.1. y figura 7.1.1.**)

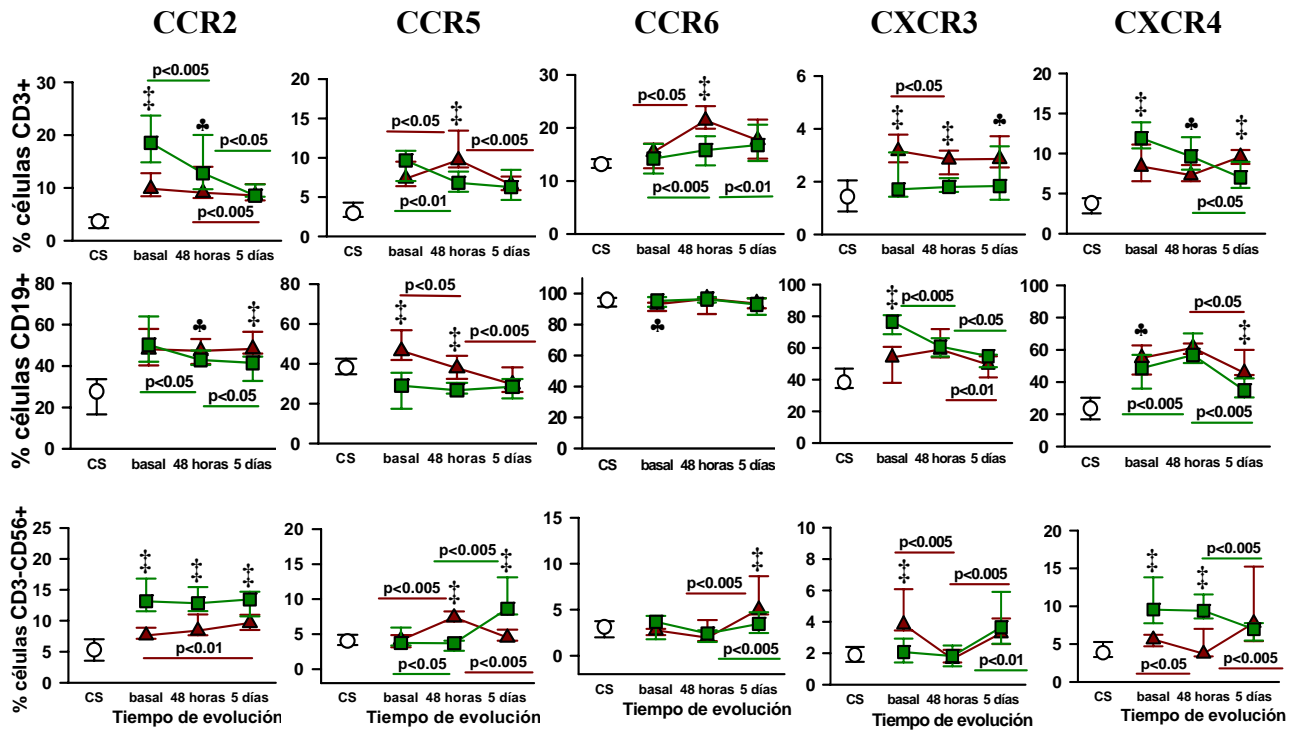
Tabla 7.1.1.: Distribución y número de linfocitos que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	CS	Pac.	Tiempo de evolución			CS	Pac.	Tiempo de evolución		
			Basal	48 horas	5 días			basal	48 horas	5 días
			%					Nº de células/ μ l		
CD3+CCR2+	3.67	PAL	9.83 ^{a,c}	9.07 ^{a,d}	8.57 ^a	55	PAL	100 ^a	130 ^{a,d}	124 ^a
		PAG	18.52 ^a	12.78 ^a	8.52 ^a		PAG	92 ^a	92 ^a	103 ^a
CD19+CCR2+	27.72	PAL	48.09 ^a	47.31 ^{a,d}	48.22 ^{a,c}	48	PAL	66 ^b	54	83 ^{a,d}
		PAG	50.16 ^a	42.92 ^a	41.5 ^a		PAG	45	50	59
CD3-CD56+CCR2+	5.33	PAL	7.64 ^a	8.42 ^a	9.65 ^a	11	PAL	31 ^a	37 ^a	32 ^a
		PAG	13.15 ^{a,c}	12.85 ^{a,c}	13.45 ^{a,c}		PAG	38 ^a	37 ^a	34 ^a
CD3+CCR5+	2.94	PAL	7.35 ^a	9.70 ^{a,c}	6.59 ^a	45	PAL	77 ^a	135 ^{a,c}	91 ^a
		PAG	9.65 ^a	6.82 ^a	6.27 ^a		PAG	52	49	80 ^a
CD19+CCR5+	38.12	PAL	46.44 ^a	37.81 ^c	29.67 ^{a,c}	78	PAL	61 ^{b,c}	45 ^{a,d}	49 ^a
		PAG	29.00 ^a	26.74 ^a	28.49 ^a		PAG	27 ^a	30 ^a	44 ^a
CD3-CD56+CCR5+	4.02	PAL	4.15	7.40 ^{a,c}	4.51 ^b	10	PAL	15 ^a	30 ^{a,c}	14
		PAG	3.73	3.70 ^b	8.63 ^{a,c}		PAG	12 ^a	9 ^a	27
CD3+CCR6+	13.15	PAL	15.48 ^b	21.39 ^{a,c}	17.70 ^a	208	PAL	120 ^a	301 ^{a,c}	242
		PAG	14.22	15.82 ^b	16.76 ^a		PAG	96 ^a	119 ^a	216
CD19+CCR6+	95.87	PAL	93.27 ^{b,d}	96.64	93.53	186	PAL	98 ^a	97 ^a	148 ^b
		PAG	95.32	96.47	93.00		PAG	94	105 ^a	148 ^a
CD3-CD56+CCR6+	3.12	PAL	2.76	1.97	5.02 ^{a,c}	6	PAL	10 ^a	9 ^b	18 ^{a,d}
		PAG	3.69	2.41 ^a	3.45		PAG	7	5	9 ^a
CD3+CXCR3+	1.43	PAL	3.16 ^{a,c}	2.84 ^{a,c}	2.86 ^{a,d}	22	PAL	32 ^{b,c}	35 ^{a,c}	41 ^{a,c}
		PAG	1.71 ^b	1.80 ^b	1.83 ^b		PAG	14 ^a	14 ^b	22
CD19+CXCR3+	38.36	PAL	54.01 ^a	59.04 ^a	49.51 ^a	79	PAL	62 ^b	74	79
		PAG	76.50 ^{a,c}	60.86 ^a	54.80 ^a		PAG	74	71	74
CD3-CD56+CXCR3+	1.89	PAL	3.84 ^{a,c}	1.64	3.28 ^a	4	PAL	18 ^{a,c}	6 ^a	11 ^a
		PAG	2.07	1.82	3.66 ^a		PAG	5	5	10 ^a
CD3+CXCR4+	3.80	PAL	8.38 ^a	7.31 ^a	9.59 ^a	56	PAL	76 ^a	109 ^{a,d}	139 ^{a,d}
		PAG	11.92 ^{a,c}	9.65 ^{a,d}	7.02 ^{a,c}		PAG	72 ^b	69 ^b	86 ^a
CD19+CXCR4+	23.57	PAL	55.01 ^{a,d}	61.26 ^a	45.63 ^{a,c}	44	PAL	69 ^a	62 ^a	80 ^a
		PAG	48.67 ^a	56.82 ^a	34.79 ^a		PAG	39	59	48
CD3-CD56+CXCR4+	3.85	PAL	5.62 ^a	3.73 ^a	7.79 ^a	9	PAL	24 ^a	17 ^a	28 ^{a,d}
		PAG	9.57 ^{a,c}	9.40 ^{a,c}	6.97 ^a		PAG	28 ^a	29 ^a	17 ^a

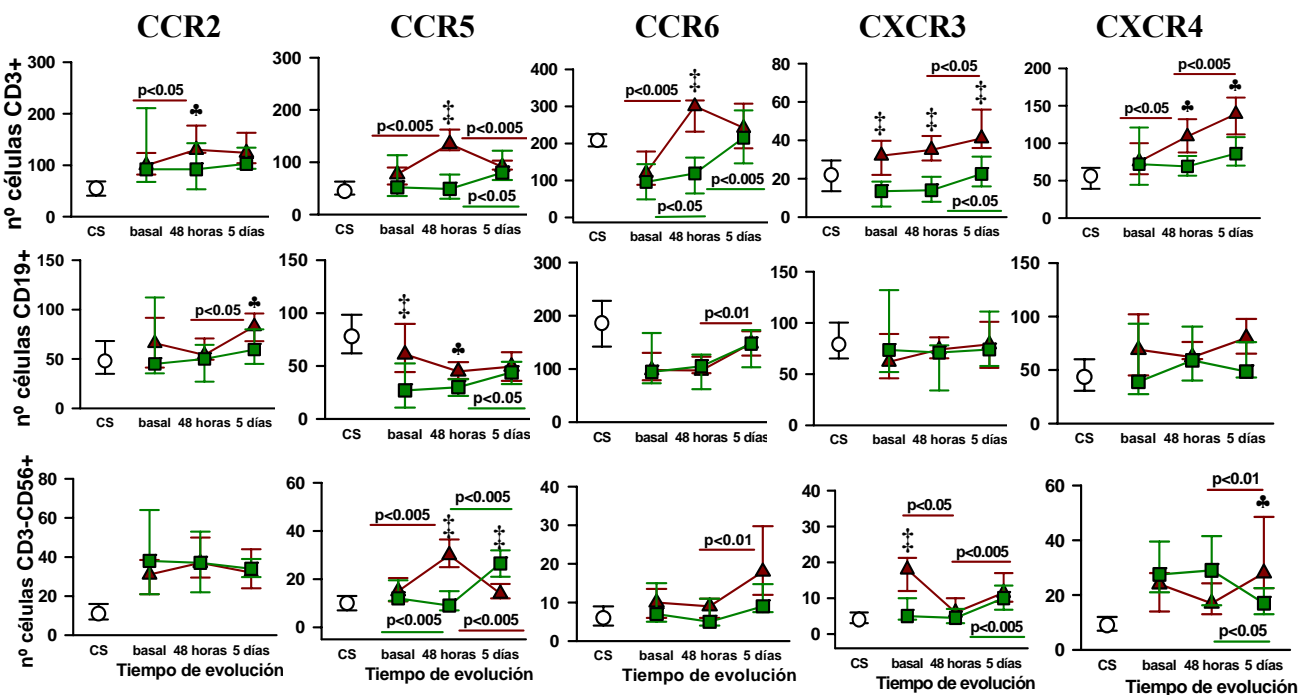
^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

PORCENTAJE DE CÉLULAS



NUMERO DE CÉLULAS POR MICROLITRO



- Controles sanos
- ▲ PA Leve
- PA Grave

Figura 7.1.1.: Expresión de quimiorreceptores en linfocitos T, linfocitos B y células NK de sangre periférica de pacientes con PA.

♣ p < 0.05 y † p < 0.005 diferencias significativas entre PA leve y PA grave

7.2. Incremento de la expresión de QRs en linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+, y aumento del número de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ que expresan QRs en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG

La expresión de QRs por la subpoblación de linfocitos T CD3+CD4+ mostró un incremento generalizado en pacientes respecto a controles sanos al inicio del brote, siendo los niveles superiores en pacientes graves respecto a leves, exceptuando la expresión de CXCR3 que fue superior en estos últimos. En pacientes con PAG, la evolución del brote provocó una disminución de la expresión de CCR2, CCR5, CXCR3 y CXCR4 en las primeras 48 horas que no normalizó los niveles, y un aumento de CCR6 al 5º día; sin embargo, los pacientes con PAL experimentaron una disminución de CCR2 y CXCR3, que tampoco alcanzó los valores control, y un aumento de CCR5 y CXCR4, a las 48 horas. Las diferencias observadas entre grupos de pacientes en la expresión de CCR5, CCR6 y CXCR4 desaparecieron al 5º día, mientras que la expresión de CCR2 y CXCR3 permaneció elevada en pacientes graves respecto a leves (**Tabla 7.2.1**).

Las diferencias entre quimiorreceptores son más acusadas cuando estudiamos el número de células, observamos un incremento de linfocitos CD3+CD4+CCR2+ y CD3+CD4+CCR5+ y una disminución de CD3+CD4+CCR6+, respecto a valores control, en ambos grupos de pacientes al inicio del brote; por otro lado, el número de linfocitos CD3+CD4+CXCR3+ disminuyó basalmente en pacientes con PAG mientras que los linfocitos CD3+CD4+CXCR4+ no experimentaron cambios. Sin embargo el incremento generalizado experimentado durante la evolución del brote, a las 48 horas en pacientes leves y al 5º día en los graves, elevó el número de linfocitos CD3+CD4+, independientemente del quimiorreceptor expresado por encima de los valores control. Las diferencias más destables entre ambos grupos de pacientes las observamos a las 48 horas de evolución del brote, con un incremento del número de linfocitos CD3+CD4+ que expresan CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR4 en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG. Los valores se equiparan al 5º día, exceptuando el nº de linfocitos CD4+CD3+CXCR3+ que se incrementan en pacientes graves respecto a leves (**Tabla 7.2.1**).

Tabla 7.2.1.: Distribución y número de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Control	Pancreatitis aguda leve			Control	Pancreatitis aguda grave			
		basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días	
		%				N° células / µl			
CD3+CD4+ CCR2+	2.91 (1.92-3.54)	PAL	9.38 ^a (8.14-10.88)	7.98 ^a (7.17-12.47)	7.39 ^{a,**} (7.11-8.08)	PAL	54 ^a (43-71)	80 ^{a,*} (68-102)	74 ^a (66-87)
		PAG	15.97 ^{a,c} (14.02-25.92)	12.87 ^{a,c,*} (10.36-20.73)	9.66 ^{a,c} (8.34-11.84)	PAG	58 ^a (38-110)	67 ^a (35-96)	90 ^a (64-128)
CD3+CD4+ CCR5+	2.75 (2.39-4.09)	PAL	7.32 ^a (6.41-9.88)	8.57 ^{a,*} (7.24-11.50)	4.63 ^{a,**} (3.87-6.43)	PAL	43 ^b (30-55)	83 ^{a,c,**} (72-98)	50 ^{a,**} (38-58)
		PAG	9.04 ^{a,d,**} (7.07-11.70)	6.75 ^{a,c} (5.62-7.93)	6.70 ^a (5.31-10.19)	PAG	35 (19-60)	34 (21-48)	70 ^{a,*} (44-106)
CD3+CD4+ CCR6+	14.46 (13.34-15.72)	PAL	18.33 ^a (14.89-22.55)	20.80 ^a (18.42-22.60)	22.87 ^a (17.07-24.56)	PAL	101 ^a (69-148)	189 ^{b,d,**} (147-228)	208 ^a (170-264)
		PAG	25.25 ^{a,c,*} (20.28-29.03)	21.20 ^a (18.35-26.49)	21.80 ^a (18.25-25.40)	PAG	96 ^a (59-152)	95 ^b (73-166)	221 ^{b,*} (139-258)
CD3+CD4+ CXCR3+	1.23 (0.89-1.95)	PAL	2.39 ^{a,c} (1.75-3.44)	1.74 ^{b,*} (1.44-2.01)	1.75 ^a (1.39-2.63)	PAL	14 ^d (7-22)	16 ^c (11-21)	18 ^b (13-26)
		PAG	1.57 ^b (1.39-1.77)	1.57 (1.39-1.84)	2.66 ^{a,c,**} (2.53-3.24)	PAG	7 ^a (3-10)	8 ^a (5-11)	29 ^{a,d,**} (23-32)
CD3+CD4+ CXCR4+	3.19 (2.15-4.43)	PAL	6.67 ^a (5.63-9.99)	7.32 ^{a,*} (6.72-9.30)	5.70 ^a (5.35-7.47)	PAL	39 (26-53)	77 ^{a,d,**} (66-89)	65 ^a (52-80)
		PAG	11.58 ^{a,c} (10.22-14.95)	8.56 ^{a,*} (7.47-13.59)	7.19 ^a (5.61-8.90)	PAG	39 (24-67)	47 ^b (28-77)	62 ^a (46-77)
CD3+CD8+ CCR2+	5.52 (3.68-6.42)	PAL	10.57 ^a (8.89-16.07)	8.63 ^a (6.96-14.17)	11.25 ^{a,*} (9.47-15.07)	PAL	37 ^a (31-58)	37 ^{a,d} (27-52)	40 ^a (30-71)
		PAG	16.82 ^{a,c} (15.08-22.11)	13.00 ^{a,c} (10.80-24.46)	13.32 ^a (10.25-16.88)	PAG	41 ^b (21-78)	26 [*] (21-41)	36 ^a (25-55)
CD3+CD8+ CCR5+	3.83 (2.80-4.99)	PAL	9.21 ^a (8.23-14.09)	10.21 ^a (7.11-14.33)	7.90 ^{a,*} (6.17-10.35)	PAL	35 ^a (26-48)	48 ^{a,c} (29-59)	27 ^{a,*} (22-36)
		PAG	9.93 ^a (8.47-13.17)	9.46 ^a (8.32-12.56)	8.33 ^a (7.25-12.64)	PAG	23 (13-53)	21 (16-32)	28 ^a (21-35)
CD3+CD8+ CCR6+	6.36 (5.54-7.17)	PAL	8.41 ^{a,c} (6.56-10.29)	6.69 (6.23-7.98)	9.01 ^b (5.77-11.04)	PAL	26 ^{b,c} (19-36)	26 ^c (22-39)	30 (17-37)
		PAG	4.90 ^a (3.56-5.63)	6.26 [*] (5.40-7.02)	10.86 ^{a,*} (6.73-13.11)	PAG	11 ^a (9-19)	14 ^a (6-20)	25 [*] (20-38)
CD3+CD8+ CXCR3+	2.1 (1.63-3.11)	PAL	5.89 ^{a,c} (5.22-7.10)	3.30 ^{a,d,**} (2.58-4.29)	2.31 (1.56-3.08)	PAL	23 ^{a,c} (16-30)	14 ^{c,*} (10-19)	9 [*] (6-15)
		PAG	1.89 (1.57-4.42)	2.22 (1.43-3.67)	4.00 ^{a,c,**} (2.86-5.04)	PAG	6 ^a (3-10)	5 ^a (2-8)	9 [*] (8-16)
CD3+CD8+ CXCR4+	5.11 (4.10-7.30)	PAL	11.53 ^a (8.21-14.48)	8.25 ^{a,*} (6.96-9.07)	10.49 ^a (8.25-13.37)	PAL	37 ^a (29-51)	34 ^b (24-44)	39 ^b (21-63)
		PAG	11.93 ^{a,d} (10.41-18.31)	14.53 ^{a,c} (10.12-23.83)	12.80 ^a (8.97-15.39)	PAG	25 ^a (16-59)	21 ^a (19-42)	34 ^a (24-56)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

** p<0.005 y * p<0.05 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

El patrón de expresión de QRs por la subpoblación de linfocitos T CD3+CD8+, respecto a controles sanos, fue similar al observado en la subpoblación CD3+CD4+, niveles de expresión basales superiores, exceptuando la expresión de CCR6 y CXCR3, inferior y sin cambios respectivamente, en pacientes con PAG, que permanecen elevados o se incrementan tras 5 días de evolución del brote. La modulación en la expresión de los QRs durante el brote varía dependiendo del QR y la gravedad de la enfermedad, pero en pacientes leves la tendencia es descendente mientras que en los graves es ascendente. Además los pacientes graves mostraron un incremento en la expresión CCR2 y CXCR4, y una disminución de CCR6 y CXCR3 respecto a los leves, que desapareció al 5° día de evolución del brote, exceptuando la expresión de CXCR3 que se incrementó (**Tabla 7.2.1**).

Igualmente, y en términos generales, el número de linfocitos CD3+CD8+ que expresan QRs fue mayor en pacientes con PAL respecto a controles sanos al inicio del brote, exceptuando el número de linfocitos CD3+CD8+CCR6+ que fue menor, mientras que en pacientes con PAG fue inferior o se mantuvo sin cambios. Sin embargo, y a diferencia de la subpoblación CD3+CD4+, el número de linfocitos CD3+CD8+CCR6+ y CD3+CD8+CXCR3+ se normalizó con la evolución del brote en ambos grupos de pacientes. La modulación en el número de linfocitos durante el brote es similar a la observada en el estudio del porcentaje, con una tendendencia descendente en pacientes leves y ascendente en pacientes graves. Las mayores diferencias entre grupos de pacientes también se produjeron a las 48 horas, con niveles superiores en pacientes leves respecto a graves que se equiparan al 5° día de evolución (**Tabla 7.2.1**).

7.3. Alteraciones en la expresión de QRs en subpoblaciones de linfocitos T y B relacionadas con la función y el grado de activación

En términos generales, el estudio de la expresión de QRs en diferentes subpoblaciones de linfocitos reveló un incremento de los niveles de CCR2, CCR5, CXCR3 y CXCR4, y una disminución de CCR6, en linfocitos T naïve (CD3+CD45RA+), linfocitos T activados (CD3+CD45RO+, CD4+CD25+, CD8+CD25+, CD3+CD56+, CD3+CD11b+, CD4+CD28+ y CD8+CD28+), y linfocitos B activados (CD19+CD11b+) al inicio del brote (basal), respecto a controles sanos. Por el contrario, observamos una disminución basal de QRs en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+CD28- y CD8+CD28-. Durante la evolución del brote se produjo un incremento de los niveles de expresión de QRs en la mayoría de las subpoblaciones con fluctuaciones a las 48 horas; y con excepción de algunos QRs en

subpoblaciones muy concretas de pacientes leves y graves, no se normalizan los valores al 5º día.

El número de linfocitos que expresan QR fue generalmente menor en pacientes respecto a controles sanos independientemente de la gravedad de la enfermedad, aunque los pacientes con PAL mostraron incrementos significativos del nº de linfocitos T CD3+CD45RO+, CD8+CD25+ y CD3+CD56+ que expresan CCR2+, CCR5+, CXCR3+ y CXCR4+. El nº de linfocitos QR+ aumentó con la evolución del brote, pero en pacientes con PAL se produjo un nuevo descenso al 5º día en linfocitos T CD3+CD45RO+, CD8+CD25+ y CD8+CD28+. Las subpoblaciones CD4+CD25+, CD8+CD25+ y CD19+CD11b+ que expresan QRs no mostraron modulación significativa durante el brote, respectos a valores basales, en pacientes con PAG, mientras que en los pacientes leves fueron las subpoblaciones CD4+CD28-, CD8+CD28- y CD19+CD11b+. En general no se normalizaron los valores, e incluso se incrementaron respecto a controles al 5º día en ciertas poblaciones (CD3+CD45RO+, CD3+CD56+ y CD3+CD11b+).

Las principales diferencias entre ambos grupos de pacientes se observaron a las 48 horas de evolución del brote. Los resultados del estudio de porcentaje fueron variables en función de la subpoblación y el QR expresado, mientras que el nº de linfocitos T QR+ fue similar en pacientes con PAL y PAG, excepto incrementos puntuales en pacientes leves respecto a graves de alguna subpoblación (CD3+CD45RO+, CD8+CD25+ y CD8+CD28+).

Cuadro resumen de la distribución y número de linfocitos que expresan QRs en subpoblaciones de linfocitos T y B

Subpoblaciones de linfocitos	Controles vs pacientes	Pacientes PAL vs PAG	Evolución durante el brote
Linfocitos T naïve y memoria-efectores (Tabla 7.3.1.)			
CD3+CD45RA+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> basal de <i>QRs</i> sin normalización, excepto CCR6 en PAG y recuperación de valores control de CCR2 y CXCR3 en PAL. ➤ <i>Disminución</i> basal del n° de linfocitos CCR6+, CXCR3+ (PAG) y CXCR4+ (PAL), <i>aumento</i> de CCR2 (PAL). Normalización de CCR2+, CCR6+ y CXCR3+ en PAL. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> basal de CCR6 y CXCR3, y <i>disminución</i> de CCR2 y CXCR4 en PAL vs PAG, equiparación de niveles a 48h y 5d de evolución respectivamente. ➤ <i>Aumento</i> del n° de linfocitos CCR6+ y CXCR3+ en PAL vs PAG, equiparación de valores a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Aumento</i> y <i>disminución</i> transitoria a 48h de la expresión de CCR5 y CCR6 respectivamente, y <i>disminución</i> de CXCR3 en PAL. <i>Incremento</i> de CXCR3, y <i>disminución</i> de CCR2 y CXCR4 en PAG. ➤ <i>Disminución</i> a 48h con posterior <i>aumento</i> a 5d, del n° de linfocitos, CCR6+ y CXCR3+ en PAL, y predominio del <i>aumento</i> de <i>linfocitos QR+</i> en PAG a 5d.
CD3+CD45RO+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> basal de <i>QRs</i> excepto <i>disminución</i> de CCR6 y CXCR3 normal (PAG). No se normaliza la expresión excepto CXCR3 en PAL y CCR6 en PAG. ➤ <i>Incremento</i> del n° de <i>linfocitos QR+</i>, excepto <i>disminución</i> de CCR6+, en PAL, y <i>disminución</i> de CCR6+ y CXCR3+ en PAG. Se normaliza el n° de linfocitos CCR6+ en PAL, y se produce un <i>incremento</i> general del n° de <i>linfocitos QR+</i> en PAG. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> de la expresión de CCR2 y CXCR4, y <i>aumento</i> de CCR5 y CXCR3 en PAL vs PAG. Se igualan los niveles a 5d excepto <i>incremento</i> de CCR5. ➤ <i>Aumento</i> basal del n° linfocitos CCR6+, CXCR3+ y CXCR4+ en PAL vs PAG, <i>inversión</i> de la relación en CCR5+ y CXCR3+ a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> de CCR2 y CCR5 (transitorio) y CCR6 a 48h, y <i>descenso</i> de CXCR3 a 5d en PAL. <i>Descenso</i> de CCR2 y CXCR4, y <i>aumento</i> de CCR5 y CXCR3 a 5d en PAG. ➤ <i>Aumento</i> general del n° de <i>linfocitos QR+</i> a las 48h, y <i>disminución</i> a 5d en PAL. <i>Aumento</i> de <i>linfocitos QR+</i> a 5d en PAG
Linfocitos T activados (Tablas 7.3.2. y 7.3.3.)			
CD4+CD25+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> de <i>QRs</i>, excepto <i>disminución</i> de CXCR3, y CCR6, CXCR4 (PAL). Se recuperan valores control de CCR2 y CXCR4 (ambos grupos), de CCR6 (PAL) y CCR5 (PAG). ➤ <i>Disminución</i> basal del n° de linfocitos CXCR3+ y CXCR4+, e <i>incremento</i> de CCR2+ (PAG). Normalización de valores en PAL a 48h, e <i>incremento</i> del n° de linfocitos CXCR4+ en PAG a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> de CCR2 (basal), CCR6 (48h), CXCR4 (48h) y CCR5 (5d), y <i>aumento</i> de CXCR3 (5d) en PAL vs PAG. ➤ <i>Diferencias puntuales no destacables</i> en el n° de linfocitos QR+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> de CCR2 (ambos grupos), CCR5 y CCR6 (PAL) y CXCR3 (PAG). <i>Aumento</i> de CXCR4 (ambos grupos) y CXCR3 (PAL). ➤ <i>Aumento</i> del n° de <i>linfocitos QR+</i> a 48h en PAL, y de linfocitos CCR2+ y CCR5+ a 5d en PAG.
CD8+CD25+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> basal de CCR2, CCR5 (PAL) y CXCR3 (PAG), y <i>disminución</i> de CCR6. No se normalizan los valores, excepto CCR2 (PAL). 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> de <i>QRs</i> en PAL vs PAG a 48h, y de PAG vs PAL 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> de <i>QRs</i>, predominantemente a 48h en PAL y a 5d en PAG, con fluctuaciones a 5d y 48h respectivamente.

Cuadro resumen (continuación)

Subpoblaciones de linfocitos	Controles vs pacientes	Pacientes PAL vs PAG	Evolución durante el brote
Linfocitos T activados (Tablas 7.3.2. y 7.3.3.)			
CD8+CD25+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento del nº de linfocitos CCR2+, CCR5+ y CXCR4+ (48h), con normalización de valores a 5d, y disminución CCR6+ en PAL. Disminución de linfocitos QR+ en PAG con normalización de CCR5+ y CXCR3+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento del nº de linfocitos QR+, excepto CCR6+, en PAL vs PAG, equiparación de valores a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento del nº de linfocitos QR+ a las 48h y disminución a 5d en PAL; e incremento de linfocitos CXCR3+ a 48h y disminución a 5d en PAG.
CD3+CD56+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de QRs excepto disminución de CCR6 y CCR2 sin diferencias en PAL. No se normalizan valores excepto CCR6 y CXCR3 (PAG). ➤ Aumento del nº de linfocitos CCR5+, CXCR3+ y CXCR4+, y disminución de CCR6+. No se normalizan valores excepto linfocitos CCR6+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de CCR6 y CXCR3, y disminución de CCR5 y CXCR4, a 48h en PAL vs PAG. Valores similares a 5d excepto CXCR3. ➤ Diferencias puntuales no destacables en el nº de linfocitos QR+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Modulación diferente en función del QR en PAL y PAG con tendencia al aumento de expresión y fluctuaciones a 48h. ➤ Aumento del nº de linfocitos QR+ a 48h en PAL y a 5d en PAG.
CD3+CD11b+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de QRs, excepto CXCR3, en PAL, incremento de CCR2 y CXCR4, y disminución de CCR5, CCR6 y CXCR3 en PAG. Normalización de CCR5 y CXCR3. ➤ Aumento puntual a 5d del nº de linfocitos CCR2+, CXCR3+ y CXCR4+ en PAL, y disminución de CCR5+, CCR6+ y CXCR3+ a 48h en PAG con normalización de valores CCR5+ y CXCR3+ a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de CCR6 y CXCR3, y disminución de CXCR4 en PAL vs PAG, se equiparan niveles de CXCR3 y CXCR4. ➤ Diferencias puntuales no destacables. en el nº de linfocitos QR+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de CXCR3 y CXCR4 en PAL, y de CCR5, CCR6 y CXCR3 en PAG a 5d. ➤ Aumento del nº de linfocitos QR+ predominantemente a 5d.
Linfocitos T reguladores y supresores (Tablas 7.3.4. y 7.3.5.)			
CD4+CD28+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de QRs sin normalización de valores, excepto CCR5 en PAL y CXCR4 en PAG. ➤ Disminución basal del nº de linfocitos QR+ en PAL, y de CCR5+, CCR6+ y CXCR3+ en PAG. Normalización de valores a 48h, excepto incremento de CCR2+ en PAL, y CCR5+ y CCR6+ en PAG. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Disminución de CCR2, CCR5 y CXCR4 en PAL vs PAG. Inversión de la relación en CCR2 y CXCR4, y equiparación de CCR5 a 5d. ➤ Diferencias puntuales no destacables en el nº de linfocitos QR+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Modulación diferente en función del QR y de la gravedad, con predominio de descenso a 48h y aumento a 5d. ➤ Incremento del nº de linfocitos QR+, predominantemente a 5d en PAG.
CD8+CD28+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de CCR5, CXCR3 y CXCR4, y disminución de CCR6. Normalización de CXCR3 en PAL e incremento de QRs en PAG a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de CCR5 y CCR6 y disminución de CXCR4 en PAL vs PAG a 48h. Valores similares de CCR5 y CXCR4 e inversión de la relación en CCR6 a 5d. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incremento de QRs, a 48h en PAL y a 5d en PAG, y disminución a 5d en PAL

Cuadro resumen (continuación)

Subpoblaciones de linfocitos	Controles vs pacientes	Pacientes PAL vs PAG	Evolución durante el brote
Linfocitos T reguladores y supresores (Tablas 7.3.4. y 7.3.5.)			
CD8+CD28+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i>, excepto CXCR3+ y CXCR4+ en PAL. Normalización de valores CCR2+ y CCR5+ en PAL y CXCR4+ en PAG. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Aumento</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i>, excepto CXCR4, en PAL vs PAG a 48h. Valores similares a 5d excepto <i>inversión</i> de la relación en CXCR3+. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i>, a 48h en PAL y a 5d en PAG, y <i>disminución</i> a 5d en PAL.
CD4+CD28-	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> de <i>QRs</i> excepto CCR5. Únicamente normalización de CCR6 en PAG. ➤ <i>Disminución</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i> excepto CCR5+, sin normalización de valores. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> de <i>QRs</i> en PAL vs PAG, sin equiparación de niveles a 5d. ➤ Diferencias puntuales <i>no destacables</i> en el n° de linfocitos <i>QR+</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Modulación</i> diferente en función del <i>QR</i> y la gravedad, con predominio del <i>incremento</i> a 48h y la <i>disminución</i> a 5d. ➤ <i>Modulación</i> diferente del n° de linfocitos en función del <i>QR</i> expresado en PAG. Sin cambios significativos en PAL.
CD8+CD28-	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Disminución</i> de <i>QRs</i> excepto CXCR3 en PAL. <i>Incremento</i> de CCR2 y CCR5 (PAL) y CXCR3 a 5d. Normalización de CCR5 y CCR6 en PAG. ➤ <i>Disminución</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i>, excepto CCR5+ y CXCR3+ en PAL. Normalización de valores CCR2+ y CXCR4+ en PAL, y CCR5+ y CCR6+ en PAG. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Diferencias puntuales <i>no destacables</i>, con predominio del <i>incremento</i> de <i>QRs</i> en PAL vs PAG. ➤ Diferencias puntuales <i>no destacables</i> en el n° de linfocitos <i>QR+</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Predominio del <i>incremento</i> de <i>QRs</i> con algunas fluctuaciones a 48h. ➤ <i>Aumento</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i> en PAL, y <i>disminución</i> transitoria a 48h seguida de <i>aumento</i> a 5d en PAG.
Linfocitos B activados (Tabla 7.3.6.)			
CD19+CD11b+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> de <i>QRs</i> excepto CCR6 y <i>disminución</i> de CCR5 (PAG). Únicamente se normalizan niveles de CCR2 en PAG. ➤ <i>Disminución</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i> excepto CXCR4+ que se incrementa en PAL y no varía en PAG. Normalización de linfocitos CCR2+, CCR6+ en PAL y CXCR3+ en ambos grupos. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Diferencias puntuales <i>no destacables</i> con predominio del <i>incremento</i> de <i>QRs</i> en PAL vs PAG. ➤ Diferencias puntuales <i>no destacables</i> en el n° de linfocitos <i>QR+</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Incremento</i> transitorio a 48h y <i>disminución</i> a 5d de CXCR3 en PAL y de CXCR4 en PAG. ➤ <i>Aumento</i> del n° de linfocitos <i>QR+</i> en PAL. Sin cambios significativos en PAG.

Tabla 7.3.1.: Distribución y número de linfocitos T CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	control	Pancreatitis aguda leve			control	Pancreatitis aguda grave				
		basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días		
		%				N° células / µl				
CD3+CD45RA+ CCR2+	3.98 (3.00-5.44)	PAL	10.27 ^a (8.78-12.84)	9.50 ^a (6.92-15.35)	5.00 (2.27-13.85)	36 (26-51)	PAL	48 ^b (32-67)	51 ^b (38-64)	43 (16-106)
		PAG	13.55 ^{a,c} (12.48-15.37)	16.35 ^{a,d} (10.08-18.36)	8.73 ^{a,*} (8.02-12.03)		PAG	36 (26-61)	41 (24-76)	49 (33-58)
CD3+CD45RA+ CCR5+	3.98 (3.43-4.78)	PAL	7.92 ^a (6.98-9.71)	9.41 ^{a,**} (7.79-13.11)	7.61 ^{a,*} (5.15-8.69)	36 (28-45)	PAL	32 (27-49)	46 ^{a,c,*} (42-51)	46 ^b (36-52)
		PAG	10.47 ^a (7.40-12.14)	8.98 ^a (7.78-10.03)	7.27 ^a (6.59-11.25)		PAG	26 (17-48)	34 (17-40)	42 (30-58)
CD3+CD45RA+ CCR6+	3.42 (2.67-5.35)	PAL	4.76 ^{a,c} (3.81-7.10)	3.23 (2.82-3.89)	4.87 ^{a,*} (3.84-7.12)	34 (26-50)	PAL	23 ^{a,d} (12-31)	14 ^{a,*} (12-18)	25 (23-50)
		PAG	3.47 (2.38-4.87)	3.92 (2.87-6.86)	4.17 (2.93-5.82)		PAG	11 ^a (6-16)	11 ^{a,*} (9-17)	19 ^{a,*} (15-32)
CD3+CD45RA+ CXCR3+	1.99 (1.67-2.71)	PAL	3.40 ^{a,c} (2.53-5.88)	2.15 (1.43-3.71)	2.61 (1.72-3.38)	18 (15-23)	PAL	17 ^c (10-23)	12 ^{a,d,*} (8-16)	18 (12-25)
		PAG	1.87 (1.74-2.48)	2.10 (1.52-3.35)	2.93 ^{a,*} (2.59-3.54)		PAG	5 ^a (3-8)	6 ^{a,*} (3-10)	15 ^{b,*} (12-17)
CD3+CD45RA+ CXCR4+	4.72 (3.70-6.23)	PAL	7.85 ^a (6.70-9.85)	6.14 (2.31-11.52)	7.89 ^a (7.31-8.97)	42 (35-55)	PAL	33 ^a (21-43)	27 (12-91)	60 ^{b,d} (41-77)
		PAG	13.50 ^{a,c} (10.21-15.87)	13.45 ^{a,c} (10.80-16.63)	7.22 ^{a,**} (6.01-8.02)		PAG	39 (22-60)	45 (22-64)	36 (21-45)
CD3+CD45RO+ CCR2+	6.38 (5.64-7.36)	PAL	9.75 ^a (7.64-11.69)	10.84 ^{a,*} (8.61-16.80)	9.47 ^{a,*} (8.39-13.09)	38 (33-47)	PAL	47 ^b (33-57)	103 ^{a,d,**} (73-145)	65 ^{a,**} (53-102)
		PAG	13.83 ^a (12.98-19.15)	13.80 ^{a,c} (11.74-21.99)	11.75 ^{a,d} (8.11-14.26)		PAG	43 (32-87)	60 ^a (34-100)	78 ^a (56-109)
CD3+CD45RO+ CCR5+	5.31 (3.72-6.52)	PAL	7.36 ^a (6.88-8.94)	9.03 ^{a,d,*} (8.24-11.06)	5.52 ^{b,**} (4.85-7.74)	30 (22-38)	PAL	37 ^a (32-52)	85 ^{a,c,**} (62-106)	40 ^{a,**} (30-53)
		PAG	9.02 ^a (6.57-10.41)	7.58 ^a (6.52-8.49)	8.98 ^{a,c,*} (8.16-15.06)		PAG	26 (16-54)	36 (23-48)	78 ^{a,c,**} (53-126)
CD3+CD45RO+ CCR6+	32.76 (30.81-37.05)	PAL	25.33 ^a (19.94-29.23)	28.66 ^{b,*} (23.71-36.54)	29.64 ^b (27.44-35.09)	201 (182-232)	PAL	123 ^a (87-156)	270 ^{b,c,**} (210-339)	244 (172-296)
		PAG	26.67 ^a (22.45-32.12)	31.05 (18.76-37.35)	29.63 (23.55-37.21)		PAG	89 ^a (48-156)	117 ^{a,*} (59-175)	203 (168-284)
CD3+CD45RO+ CXCR3+	1.93 (1.55-2.28)	PAL	3.19 ^a (2.71-5.22)	2.92 ^{a,c} (2.60-3.45)	2.29 (1.54-3.35)	12 (9-15)	PAL	18 ^{a,c} (12-20)	26 ^{a,c,*} (20-31)	16 ^{b,*} (12-23)
		PAG	1.97 (1.49-3.36)	1.91 (1.56-2.92)	2.55 ^{a,d,*} (2.23-5.86)		PAG	7 ^a (4-12)	10 (5-14)	21 ^{a,d,**} (17-31)
CD3+CD45RO+ CXCR4+	5.25 (3.95-6.81)	PAL	8.33 ^a (7.08-12.24)	7.37 ^a (7.17-7.99)	8.07 ^a (6.72-11.18)	30 (24-42)	PAL	44 ^a (35-57)	69 ^{a,**} (63-76)	54 ^a (46-81)
		PAG	12.60 ^{a,c} (9.64-14.27)	11.84 ^{a,c} (9.12-16.73)	7.04 ^{a,**} (6.46-9.14)		PAG	39 (22-59)	53 ^a (33-65)	62 ^a (39-67)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

** p<0.005 y * p<0.05 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

Tabla 7.3.2.: Distribución y número de linfocitos T CD4+CD25+ y CD8+CD25+ que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Control	Pancreatitis aguda leve			Control	Pancreatitis aguda grave				
		basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días		
		%				Nº células / µl				
CD4+CD25+ CCR2+	17.17 (12.98-18.93)	PAL	19.63 ^b (15.76-24.12)	15.17 [*] (12.57-18.26)	19.17 (14.19-20.58)	7 (6-9)	PAL	7 (6-9)	10 (6-12)	11 (5-13)
		PAG	32.50 ^{a,c} (30.78-40.67)	15.68 ^{**} (13.37-21.20)	19.86 (11.75-27.27)	7 (6-9)	PAG	12 ^b (7-19)	8 [*] (4-12)	11 ^{a,**} (8-16)
CD4+CD25+ CCR5+	15.27 (12.27-17.68)	PAL	19.68 ^a (16.45-24.23)	20.59 ^{b,c} (16.21-22.91)	10.99 ^{a,*} (8.57-12.52)	9 (6-12)	PAL	7 (5-10)	13 ^{d,*} (8-17)	6 ^{b,*} (4-8)
		PAG	17.69 ^b (16.17-25.27)	10.23 ^{b,**} (9.05-16.15)	15.04 ^{c,*} (12.22-21.81)	9 (6-12)	PAG	5 (3-13)	5 ^b (3-11)	9 ^{c,*} (8-12)
CD4+CD25+ CCR6+	32.74 (30.18-34.66)	PAL	32.20 ^{a,*} (27.99-40.21)	26.98 ^{a,*} (23.76-29.34)	32.43 (30.17-42.00)	15 (13-20)	PAL	12 (10-15)	17 (13-22)	18 (10-34)
		PAG	34.59 ^a (33.33-36.88)	35.70 ^{b,c} (32.13-38.29)	35.07 ^b (32.68-40.41)	15 (13-20)	PAG	11 (7-19)	16 (10-27)	21 ^b (17-27)
CD4+CD25+ CXCR3+	6.4 (4.78-7.90)	PAL	3.00 ^a (2.48-5.58)	3.51 ^a (3.07-4.35)	8.73 ^{a,c,*} (8.21-13.46)	3 (2-5)	PAL	1 ^a (1-2)	2 (1-3)	5 ^{d,*} (3-7)
		PAG	4.26 ^b (3.26-6.58)	3.00 ^{a,*} (2.45-3.62)	3.03 ^a (2.62-5.00)	3 (2-5)	PAG	2 ^a (1-2)	2 ^a (1-2)	2 ^b (1-3)
CD4+CD25+ CXCR4+	17.05 (14.87-22.35)	PAL	14.07 (12.92-22.09)	13.39 ^a (11.11-15.29)	19.72 (15.06-20.67)	9 (7-11)	PAL	5 ^a (4-8)	9 (6-12)	10 (6-17)
		PAG	16.14 (13.95-19.88)	24.00 ^{a,c,**} (19.44-31.40)	20.04 (16.06-24.43)	9 (7-11)	PAG	5 ^b (4-9)	11 (7-17)	12 ^b (8-17)
CD8+CD25+ CCR2+	41.79 (38.42-46.36)	PAL	46.50 ^a (44.05-53.16)	68.27 ^{a,c,*} (51.55-71.35)	42.35 [*] (37.12-45.53)	6 (4-10)	PAL	7 (4-11)	20 ^{a,c,*} (8-29)	4 (2-9)
		PAG	55.56 ^{a,d} (47.93-63.64)	37.96 ^{**} (33.74-45.04)	60.33 ^{a,d,**} (42.79-66.39)	6 (4-10)	PAG	3 ^b (2-8)	4 ^a (1-5)	4 ^b (3-7)
CD8+CD25+ CCR5+	34.47 (31.46-38.13)	PAL	38.57 ^b (34.87-44.53)	48.65 ^{a,c,*} (41.97-50.00)	49.95 ^a (43.79-53.00)	6 (3-7)	PAL	6 (4-8)	14 ^{b,c,*} (6-21)	5 (2-10)
		PAG	39.13 (28.57-44.44)	35.60 (30.00-39.90)	66.29 ^{a,c,**} (52.27-70.68)	6 (3-7)	PAG	2 ^b (1-5)	3 (1-5)	4 (3-8)
CD8+CD25+ CCR6+	45.00 (42.37-48.92)	PAL	30.00 ^a (28.75-38.67)	21.00 ^{a,*} (16.90-23.21)	31.43 ^{a,*} (27.38-38.50)	7 (4-11)	PAL	5 ^b (3-7)	5 (3-9)	4 ^{b,*} (2-7)
		PAG	34.69 ^a (30.57-36.84)	36.67 ^{a,c,*} (34.94-42.92)	54.36 ^{b,c,**} (40.83-60.08)	7 (4-11)	PAG	2 ^a (1-5)	4 ^a (2-6)	5 ^b (3-6)
CD8+CD25+ CXCR3+	25.06 (21.76-28.59)	PAL	25.00 (20.10-34.19)	24.61 ^c (16.16-27.86)	19.35 ^a (13.51-22.18)	5 (2-6)	PAL	4 (2-6)	7 ^{c,*} (4-9)	2 (1-4)
		PAG	39.47 ^{a,c} (33.78-47.70)	14.25 ^{a,**} (13.37-15.83)	45.83 ^{a,c,**} (39.68-54.64)	5 (2-6)	PAG	2 (1-5)	1 ^{a,*} (1-2)	3 (2-5)
CD8+CD25+ CXCR4+	40.87 (35.63-43.84)	PAL	39.99 (32.57-44.43)	51.06 ^{a,c,*} (46.01-59.83)	56.41 ^{a,c} (46.45-59.54)	6 (4-10)	PAL	7 ^d (3-9)	17 ^{a,c,*} (7-23)	8 (2-15)
		PAG	23.33 ^a (20.00-26.92)	43.04 ^{**} (38.09-45.76)	48.39 ^{a,*} (40.14-59.15)	6 (4-10)	PAG	1 ^a (1-3)	4 ^b (2-5)	3 ^b (2-6)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

^{**} p<0.005 y ^{*} p<0.05 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

Tabla 7.3.3.: Distribución y número de linfocitos T CD3+CD56+ y CD3+CD11b+ que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Control	Pancreatitis aguda leve			Control	Pancreatitis aguda grave				
		Basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días		
			%				N° células /μl			
CD3+CD56+ CCR2+	11.87 (9.95-15.55)	PAL	12.49 (9.73-20.33)	13.25 (10.71-18.63)	14.60 (9.25-25.36)	15 (12-20)	PAL	13 (10-17)	17** (14-30)	17 (9-28)
		PAG	23.21 ^{a,c} (17.26-25.68)	15.28 ^a (13.06-21.94)	15.28 ^a (13.02-19.85)		PAG	18 (10-28)	14 (7-25)	24 ^{a,*} (19-30)
CD3+CD56+ CCR5+	7.29 (5.79-8.83)	PAL	14.05 ^a (9.36-15.54)	8.45 ^{b,**} (6.96-10.67)	12.78 ^{a,**} (10.62-19.14)	9 (6-12)	PAL	14 ^a (10-18)	13 ^b (7-17)	16 ^a (12-20)
		PAG	13.27 ^a (9.07-24.69)	16.34 ^{a,c} (10.59-17.26)	13.99 ^a (11.17-17.77)		PAG	14 ^a (9-21)	13 ^b (8-17)	19 ^{a,**} (15-27)
CD3+CD56+ CCR6+	14.29 (11.02-16.34)	PAL	10.84 ^b (8.69-15.57)	10.95 ^{b,c} (8.69-14.09)	14.46 (11.30-19.69)	17 (12-22)	PAL	11 ^a (8-14)	14 ^{c,**} (11-23)	17 (13-19)
		PAG	10.30 ^a (8.56-13.41)	8.46 ^{a,**} (7.14-9.42)	13.01 (8.58-18.10)		PAG	10 ^a (6-13)	6 ^{a,**} (3-9)	19 (14-31)
CD3+CD56+ CXCR3+	3.57 (2.49-4.09)	PAL	4.05 ^{b,d} (2.99-5.72)	6.61 ^{a,c,**} (5.32-8.11)	5.63 ^{a,d,*} (4.25-7.92)	4 (3-5)	PAL	4 (3-5)	9 ^{a,c,**} (6-12)	5 ^a (4-9)
		PAG	3.43 (1.85-4.38)	3.93 ^{b,**} (3.44-5.23)	4.01 (2.64-5.82)		PAG	2 ^b (1-4)	3 (2-4)	5 ^b (4-7)
CD3+CD56+ CXCR4+	9.23 (6.44-11.20)	PAL	12.26 ^a (8.38-13.29)	14.18 ^{a,**} (10.74-16.32)	16.76 ^{a,*} (13.51-20.00)	10 (8-15)	PAL	11 (8-14)	19 ^{a,**} (13-24)	19 ^a (12-28)
		PAG	14.43 ^{a,c} (12.13-15.80)	20.32 ^{a,c,**} (18.47-23.24)	12.26 ^{a,*} (10.99-18.35)		PAG	11 (9-15)	16 ^a (10-23)	19 ^a (16-32)
CD3+CD11b+ CCR2+	14.24 (11.99-18.29)	PAL	18.12 ^b (14.88-24.44)	18.06 (13.91-18.95)	18.84 ^a (18.01-24.69)	35 (30-46)	PAL	38 (20-47)	42 (36-61)	65 ^{a,*} (41-94)
		PAG	19.87 ^b (13.58-25.44)	18.07 ^b (14.91-22.76)	20.02 ^a (15.17-23.54)		PAG	36 (19-46)	30 (18-51)	53 ^{b,**} (35-60)
CD3+CD11b+ CCR5+	10.93 (9.03-13.64)	PAL	13.79 ^b (10.55-16.70)	14.78 ^{a,c} (13.61-17.77)	10.99 (8.04-15.13)	26 (22-34)	PAL	26 (17-29)	39 ^{a,c,*} (37-65)	32 (18-55)
		PAG	10.78 (9.87-14.29)	8.57 ^{b,**} (7.02-10.98)	13.32 (9.31-17.12)		PAG	17 (10-41)	17 ^{b,*} (9-30)	33 (23-41)
CD3+CD11b+ CCR6+	6.46 (5.52-7.23)	PAL	8.62 ^{a,c} (7.41-10.27)	6.37 (5.77-7.71)	7.84 ^a (7.04-11.45)	16 (13-21)	PAL	14 ^d (12-19)	19 ^d (13-24)	29 (17-32)
		PAG	5.73 (3.17-7.03)	5.61 ^b (5.18-6.22)	14.04 ^{a,d,**} (9.19-15.26)		PAG	10 ^a (5-15)	10 ^b (6-15)	35 ^{a,**} (26-40)
CD3+CD11b+ CXCR3+	2.91 (1.84-3.68)	PAL	2.97 ^d (2.32-4.80)	1.97 (1.72-2.97)	3.47 (2.48-4.70)	7 (5-9)	PAL	5 ^b (4-7)	6 (4-10)	11 ^{b,*} (6-16)
		PAG	2.20 (1.47-3.26)	1.86 ^b (1.75-2.72)	3.22 (2.55-4.07)		PAG	4 ^b (2-7)	4 ^a (2-5)	9 (7-11)
CD3+CD11b+ CXCR4+	12.78 (8.48-15.11)	PAL	16.93 ^a (11.98-24.45)	13.99 (11.77-15.18)	17.98 ^{a,*} (15.76-18.28)	29 (23-36)	PAL	37 (20-43)	36 (31-50)	50 (36-82)
		PAG	25.10 ^{a,d} (17.48-29.50)	16.74 ^{a,c,*} (15.74-18.21)	16.64 ^b (10.69-19.20)		PAG	35 (20-78)	33 (14-48)	49 ^b (29-62)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

** p<0.005 y * p<0.05 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

Tabla 7.3.4.: Distribución y número de linfocitos T CD4+CD28+ y CD8+CD28+ que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	control	Pancreatitis aguda leve			control	Pancreatitis aguda grave				
		basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días		
		%				N° células / µl				
CD4+CD28+	5.65 (4.88-6.60)	PAL	10.37 ^a (7.24-13.68)	11.83 ^a (9.28-12.95)	12.79 ^{a,c} (10.63-15.83)	63 (55-72)	PAL	40 ^a (30-55)	93 ^{b,*} (61-112)	96 ^{a,*} (72-152)
CCR2+		PAG	15.72 ^{a,c} (13.67-17.79)	12.54 ^{a,**} (11.23-16.01)	7.34 ^{a,**} (5.92-8.47)		PAG	61 (35-86)	73 (41-103)	55 (48-101)
CD4+CD28+	3.49 (2.68-4.60)	PAL	4.77 ^a (4.22-6.63)	10.96 ^{a,c,*} (8.74-12.73)	4.41 (3.09-5.77)	40 (33-45)	PAL	23 ^a (14-33)	99 ^{a,d,*} (60-116)	40 (25-45)
CCR5+		PAG	6.91 ^{a,c} (6.68-10.46)	4.59 ^{**} (3.25-7.23)	6.40 ^{a,*} (4.20-8.05)		PAG	26 ^b (21-48)	29 ^b (11-37)	49 ^{b,**} (39-85)
CD4+CD28+	13.91 (12.24-15.77)	PAL	23.59 ^a (21.60-27.87)	20.70 ^{a,*} (16.14-23.15)	23.76 ^a (20.89-25.24)	156 (136-177)	PAL	103 ^b (61-148)	181 (123-199)	200 (132-254)
CCR6+		PAG	25.23 ^a (20.16-28.43)	22.77 ^a (17.57-25.56)	20.94 ^a (15.91-24.84)		PAG	87 ^a (45-142)	106 (57-189)	203 (124-275)
CD4+CD28+	1.01 (0.60-1.60)	PAL	1.45 ^b (1.29-2.28)	1.35 (1.14-1.47)	1.63 ^{b,*} (1.16-2.37)	12 (8-15)	PAL	7 ^b (4-9)	13 (6-16)	13 (8-20)
CXCR3+		PAG	1.57 ^b (1.32-2.00)	1.58 ^b (1.26-1.79)	2.57 ^{a,c,**} (2.33-2.74)		PAG	5 ^b (3-10)	8 ^b (4-11)	24 ^{a,d,*} (18-32)
CD4+CD28+	4.78 (3.92-6.13)	PAL	6.32 ^b (5.38-7.42)	6.21 ^b (5.31-6.72)	7.98 ^{a,c,*} (7.36-9.06)	53 (45-62)	PAL	26 ^a (16-36)	51 (27-63)	65 (46-89)
CXCR4+		PAG	11.90 ^{a,c} (11.28-16.58)	9.42 ^{a,c} (8.62-12.74)	5.57 ^{**} (4.72-6.90)		PAG	51 (25-76)	59 (33-82)	50 (44-68)
CD8+CD28+	15.9 (13.56-19.98)	PAL	21.15 (13.87-24.10)	19.34 (12.83-32.39)	18.14 (14.76-22.98)	58 (45-70)	PAL	31 ^{b,d} (24-63)	58 ^c (31-80)	29 (24-81)
CCR2+		PAG	15.90 (11.50-19.99)	13.46 ^b (12.18-14.36)	19.33 [*] (14.71-21.21)		PAG	14 ^a (9-28)	16 ^a (6-22)	26 ^{a,**} (17-39)
CD8+CD28+	11.26 (7.67-13.30)	PAL	12.50 (9.08-16.57)	23.31 ^{a,c,*} (19.23-23.88)	12.46 (11.13-16.54)	35 (30-52)	PAL	26 ^{b,d} (18-31)	60 ^{b,c,*} (38-86)	22 (16-51)
CCR5+		PAG	12.00 (8.89-18.33)	15.92 ^{a,*} (13.36-19.52)	17.52 ^a (12.93-23.72)		PAG	12 ^a (8-17)	18 ^a (11-22)	22 ^{b,*} (16-42)
CD8+CD28+	10.47 (9.28-13.57)	PAL	7.24 ^a (5.06-8.78)	10.17 ^{d,*} (8.92-11.15)	7.13 ^a (6.07-7.96)	37 (32-50)	PAL	13 ^a (9-18)	26 ^{a,c,*} (20-31)	12 ^{a,*} (8-25)
CCR6+		PAG	7.78 ^a (6.01-9.23)	7.46 ^a (5.83-9.25)	13.57 ^{b,c,**} (10.43-22.14)		PAG	6 ^a (5-12)	6 ^a (5-10)	21 ^{a,**} (16-34)
CD8+CD28+	1.98 (1.60-3.13)	PAL	2.98 (2.57-3.30)	3.95 ^{a,*} (3.03-4.99)	2.58 (2.29-3.49)	8 (6-10)	PAL	6 (3-8)	12 ^{c,*} (7-15)	4 (4-10)
CXCR3+		PAG	3.61 ^a (2.16-4.54)	3.49 ^a (3.36-3.78)	8.75 ^{a,c,**} (5.58-14.15)		PAG	4 ^a (1-6)	3 ^a (2-5)	10 ^{b,d,*} (9-15)
CD8+CD28+	6.51 (5.07-7.80)	PAL	11.61 ^a (9.25-13.27)	16.15 ^a (10.48-17.61)	21.15 ^a (12.31-24.78)	24 (18-26)	PAL	24 (13-40)	40 ^{b,*} (25-54)	30 (19-99)
CXCR4+		PAG	14.05 ^a (9.27-15.83)	23.84 ^{a,c,**} (20.84-32.85)	14.46 ^{a,**} (11.70-16.28)		PAG	14 ^a (6-21)	25 ^{**} (14-40)	19 (13-31)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

^{**} p<0.005 y ^{*} p<0.05 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

Tabla 7.3.5.: Distribución y número de linfocitos T CD4+CD28- y CD8+CD28- que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	control	Pancreatitis aguda leve			control	Pancreatitis aguda grave				
		basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días		
		%				N° células / μl				
CD4+CD28- CCR2+	29.17 (24.17-32.53)	PAL	13.13 ^a (8.32-14.14)	9.74 ^a (8.59-14.19)	8.68 ^{a,*} (7.44-10.28)	9 (7-11)	PAL	5 ^a (3-7)	4 ^a (2-6)	5 ^a (3-7)
		PAG	19.41 ^{a,b} (12.35-24.88)	16.32 ^{a,c} (14.29-18.00)	18.08 ^{a,c} (12.18-20.63)		PAG	3 ^a (2-9)	3 ^{a,*} (1-6)	3 ^a (2-6)
CD4+CD28- CCR5+	9.87 (7.19-13.06)	PAL	12.63 ^{b,d} (9.96-16.79)	11.40 [*] (8.25-11.58)	5.98 ^{b,*} (5.21-8.75)	3 (2-4)	PAL	5 (2-7)	4 (2-7)	4 (3-5)
		PAG	9.23 (6.29-2.98)	15.88 ^{a,c,**} (12.30-19.51)	12.07 ^{c,*} (8.88-15.29)		PAG	2 (1-5)	3 (1-6)	2 (1-4)
CD4+CD28- CCR6+	31.56 (27.75-34.38)	PAL	6.54 ^a (5.35-8.57)	14.75 ^{a,*} (10.13-19.12)	11.74 ^a (9.03-14.40)	9 (7-12)	PAL	3 ^a (3-5)	5 ^b (2-7)	6 ^b (4-12)
		PAG	13.17 ^{a,c} (10.62-15.38)	15.36 ^{a,**} (12.40-17.87)	26.88 ^{c,*} (20.31-34.39)		PAG	2 ^a (2-5)	2 ^a (1-5)	5 ^{a,*} (3-8)
CD4+CD28- CXCR3+	20.8 (20.22-21.89)	PAL	2.63 ^a (2.15-3.64)	6.69 ^{a,*} (5.27-7.17)	3.48 ^{a,*} (3.09-5.15)	6 (5-8)	PAL	1 ^a (1-1)	3 ^a (1-3)	2 ^a (1-3)
		PAG	12.39 ^{a,c} (10.63-13.96)	5.86 ^{a,**} (5.30-6.09)	6.96 ^{a,c} (5.03-8.58)		PAG	3 ^{a,d} (1-5)	1 ^{a,**} (1-2)	1 ^a (1-2)
CD4+CD28- CXCR4+	21.26 (16.50-25.48)	PAL	10.06 ^a (8.93-15.45)	6.85 ^{a,*} (5.94-8.33)	5.54 ^{a,*} (4.81-6.38)	7 (4-10)	PAL	5 (2-8)	3 ^{a,*} (1-3)	3 ^a (2-5)
		PAG	9.20 ^a (8.22-10.63)	25.91 ^{c,**} (17.46-29.70)	9.01 ^{a,c,**} (8.35-15.08)		PAG	3 ^a (1-5)	5 ^{b,*} (2-6)	2 ^{a,**} (1-3)
CD8+CD28- CCR2+	17.61 (13.86-21.95)	PAL	15.50 ^b (10.19-16.79)	19.06 ^{a,c,*} (11.48-20.20)	24.45 ^{a,c,*} (23.42-27.29)	26 (17-34)	PAL	10 ^a (8-21)	17 ^b (15-19)	26 ^b (15-34)
		PAG	17.00 ^d (11.78-21.89)	12.68 ^{a,*} (11.06-15.39)	13.64 ^a (9.76-16.46)		PAG	24 (13-36)	14 ^{b,*} (6-27)	15 ^b (11-28)
CD8+CD28- CCR5+	9.72 (8.23-12.20)	PAL	9.26 ^a (8.19-11.00)	17.88 ^{a,c,*} (14.84-19.34)	10.25 [*] (8.75-13.77)	11 (8-20)	PAL	9 (8-11)	18 ^{c,*} (15-18)	10 ^{a,*} (7-12)
		PAG	6.68 ^a (6.21-9.53)	6.59 ^a (5.40-7.87)	10.25 ^{**} (7.55-12.95)		PAG	9 (5-21)	8 ^{**} (3-13)	12 [*] (9-19)
CD8+CD28- CCR6+	9.05 (8.36-11.45)	PAL	3.26 ^a (3.04-4.17)	5.62 ^{a,c,*} (4.65-7.67)	4.18 ^a (3.76-5.81)	14 (9-19)	PAL	4 ^a (3-6)	5 ^{a,c,*} (5-7)	5 ^a (4-5)
		PAG	3.47 ^a (2.66-3.91)	2.04 ^{a,**} (1.83-2.55)	7.85 ^{d,**} (4.75-11.61)		PAG	5 ^a (3-9)	2 ^{a,**} (1-4)	9 ^{c,**} (5-14)
CD8+CD28- CXCR3+	3.73 (3.27-4.02)	PAL	2.92 ^d (2.40-3.93)	4.41 ^a (3.58-5.01)	5.43 ^a (4.45-6.58)	5 (3-6)	PAL	3 (2-5)	4 (4-5)	6 (4-8)
		PAG	1.59 ^a (1.28-3.22)	4.40 ^{**} (3.26-5.32)	5.95 ^{b,*} (3.70-8.55)		PAG	3 ^b (1-4)	5 [*] (2-7)	7 ^b (5-10)
CD8+CD28- CXCR4+	16.19 (13.38-18.20)	PAL	10.69 ^a (7.68-11.85)	13.02 ^b (9.23-15.93)	17.27 ^d (12.26-21.12)	22 (17-30)	PAL	9 ^a (7-14)	11 ^a (10-17)	15 ^b (11-26)
		PAG	13.76 ^{b,d} (10.28-15.70)	11.25 ^a (8.93-14.28)	11.96 ^a (6.81-15.74)		PAG	18 (11-34)	14 ^{b,*} (5-27)	14 ^b (7-20)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

^{**} p<0.005 y ^{*} p<0.05 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

Tabla 7.3.6.: Distribución y número de linfocitos T CD19+CD11b+ que expresan QRs en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	control	Pancreatitis aguda leve			control	Pancreatitis aguda grave				
		basal	48 horas	5 días		basal	48 horas	5 días		
		%				N° células/ μ l				
CD19+CD11b+ CCR2+	38.00 (31.71-43.72)	PAL	43.91 ^b (38.52-48.04)	50.16 ^a (42.31-52.85)	54.82 ^{a,c,*} (47.98-61.33)	32 (24-45)	PAL	18 ^a (16-23)	24 ^b (21-30)	40 ^{d,*} (31-48)
		PAG	55.57 ^{a,c} (48.65-61.02)	51.33 ^a (47.02-56.18)	41.19 ^{**} (32.39-44.51)		PAG	20 ^b (13-37)	28 (11-36)	22 ^b (18-30)
CD19+CD11b+ CCR5+	39.62 (34.10-42.50)	PAL	43.22 ^{a,c} (38.86-56.20)	46.83 ^{b,c,*} (36.07-51.82)	35.17 ^b (24.55-39.58)	33 (26-45)	PAL	20 ^a (14-24)	24 ^a (16-31)	20 ^a (14-34)
		PAG	33.47 ^a (26.78-35.26)	32.92 ^a (28.62-35.08)	35.75 ^a (24.69-38.30)		PAG	12 ^a (7-22)	16 ^a (8-22)	19 ^a (16-29)
CD19+CD11b+ CCR6+	95.13 (89.06-97.14)	PAL	90.78 (86.46-95.74)	95.11 (90.99-97.84)	94.56 (92.94-96.91)	74 (61-106)	PAL	39 ^a (29-47)	44 ^a (40-61)	64 [*] (56-82)
		PAG	94.72 (88.83-97.50)	95.89 (92.84-98.16)	94.52 (84.62-97.73)		PAG	32 ^a (21-72)	48 ^a (21-61)	55 ^b (45-68)
CD19+CD11b+ CXCR3+	44.32 (36.14-48.56)	PAL	54.33 ^b (35.00-60.42)	68.11 ^{a,c,*} (59.90-82.84)	57.45 ^{a,d} (50.00-63.33)	36 (27-52)	PAL	22 ^a (12-28)	38 (33-42)	42 (33-50)
		PAG	69.41 ^{a,c} (61.03-83.94)	55.67 ^{b,**} (42.36-64.07)	48.39 ^b (41.96-57.73)		PAG	23 (16-56)	25 ^b (13-39)	27 (25-37)
CD19+CD11b+ CXCR4+	23.53 (19.56-27.05)	PAL	50.66 ^a (42.25-55.32)	51.34 ^a (49.31-54.59)	53.04 ^{a,c} (43.53-56.47)	19 (16-28)	PAL	20 (17-28)	23 ^b (22-30)	36 ^{a,d} (26-47)
		PAG	49.37 ^a (45.81-54.58)	60.06 ^{a,d,*} (52.66-67.57)	34.60 ^{a,**} (31.42-39.72)		PAG	21 (12-34)	29 [*] (15-41)	22 (17-26)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG.

^{**} p<0.005 y ^{*} p<0.005 diferencias significativas entre los tiempos de evolución del brote (basal vs 48h) y (48h vs 5d)

8. Citoquinas intracelulares en linfocitos T

8.1. Incremento generalizado de la producción de citoquinas intracelulares en linfocitos T naïve CD3+CD45RA+, pero únicamente de IL4 e IL6 en linfocitos T memoria/ efectores CD3+CD45RO+

Estudiamos la producción intracelular de citoquinas asociadas a respuesta inmune tipo Th1 (IL2 e IFN γ) y Th2 (IL4), proinflamatorias (TNF α e IL6) y antiinflamatoria (IL10) en linfocitos T naïve y memoria/efectores de pacientes con PA leve y grave, tras estimulación con pma+ionomicna.

Los linfocitos naïve CD3+CD45RA+ de pacientes con PA produjeron niveles mayores de citoquinas intracelulares respecto a controles sanos al inicio del brote, con excepción de la producción de IL10 en pacientes con PAG cuyos niveles fueron normales. Sin embargo la subpoblación de linfocitos memoria/efectores CD3+CD45RO+ únicamente produjo niveles significativamente mayores de IL4 e IL6 en pacientes con PAL, y de IL2, IL4 e IL6 en pacientes con PAG. En las primeras 48 horas de evolución del brote observamos una normalización de los niveles de citoquinas en linfocitos CD3+CD45RA+, con excepción de IFN γ en pacientes leves y de IL6 en pacientes graves, así mismo se produjo una disminución significativa de IL10 en pacientes leves. Esta normalización, sin embargo, fue transitoria respecto a los niveles de IL4 y TNF α , ya que en el 5° día de evolución observamos un nuevo incremento de ambas citoquinas respecto a valores control en pacientes leves, y un incremento de IL4 y disminución de TNF α en pacientes graves. También se observó un incremento significativo de la producción de IL10 por linfocitos naïve de pacientes con PAG al 5° día de evolución del brote. Por otra parte, los niveles de citoquinas en los linfocitos CD3+CD45RO+ no se normalizaron con la evolución del brote, excepto IL6 en pacientes con PAL, e IL2 en pacientes con PAG, incluso se produjo una disminución de la producción de TNF α en pacientes leves, y de IFN γ e TNF α en pacientes graves, además de un incremento de IL10 en este último grupo (**Tabla 8.1.1. y 8.1.2.**).

Cuando se analizó la cinética en la producción de citoquinas durante el brote inflamatorio se observó, en términos generales, un descenso de la producción de citoquinas por linfocitos CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ en las primeras 48 horas respecto a los valores basales,. A los 5 días de evolución se produjo un nuevo incremento de los niveles de IL4, IFN γ y TNF α por linfocitos CD3+CD45RA+, y de IL2, IL4 y IL10 por linfocitos CD3+CD45RO+ en pacientes con PAL, mientras que en pacientes con PAG disminuyeron

los niveles de IL6, IFN γ y TNF α y se incrementaron los niveles de IL10 en ambas subpoblaciones (Tabla 8.1.1. y 8.1.2.).

Tabla 8.1.1.: Expresión de citoquinas intracelulares, tras estimulación con pma+ionomicina, en linfocitos T CD3+CD45RA+ de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles	Pacientes	Tiempo de evolución			
			basal	48 horas	5 días	
CD3+CD45RA+ IL2+	22.68 (19.34-26.24)	PAL	27.26 ^b (24.36-35.34)	p<0.005	20.96 (15.71-23.68)	27.72 ^d (18.72-30.16)
		PAG	27.91 ^a (24.71-31.75)	p<0.01	22.27 (17.11-24.91)	21.34 (16.11-26.14)
CD3+CD45RA+ IL4+	0.72 (0.62-0.83)	PAL	1.41 ^a (1.29-1.56)	p<0.05	0.66 (0.52-0.96)	1.73 ^{a,c} (1.44-2.20)
		PAG	0.93 ^b (0.60-1.58)	p<0.05	0.95 (0.55-1.24)	1.10 ^a (0.95-1.40)
CD3+CD45RA+ IL6+	1.30 (1.20-1.47)	PAL	1.96 ^a (1.49-2.56)		2.53 (0.93-4.25)	1.54 (1.23-1.72)
		PAG	2.12 ^a (1.61-2.61)		1.93 ^a (1.90-2.39)	1.52 ^a (1.44-2.05)
CD3+CD45RA+ IL10+	0.89 (0.82-1.04)	PAL	1.54 ^{a,c} (1.22-1.89)	p<0.05	0.67 ^a (0.61-0.70)	0.62 (0.35-1.01)
		PAG	0.89 (0.68-1.33)	p<0.05	0.70 (0.30-1.02)	1.65 ^{a,c} (1.34-1.90)
CD3+CD45RA+ IFN γ +	15.51 (13.93-18.69)	PAL	29.17 ^a (25.18-34.96)	p<0.005	21.84 ^b (16.23-25.40)	32.14 ^{a,c} (24.71-36.60)
		PAG	23.69 ^a (21.80-32.47)	p<0.005	19.02 (13.47-23.35)	16.60 (14.96-22.68)
CD3+CD45RA+ TNF α +	13.66 (11.46-16.11)	PAL	17.31 ^a (15.36-21.44)	p<0.05	13.18 (11.84-16.22)	17.65 ^{a,c} (15.74-23.93)
		PAG	18.44 ^a (14.62-24.09)	p<0.005	15.93 (13.05-20.46)	10.06 ^b (8.72-15.23)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Las mayores diferencias en la producción de citoquinas intracelulares respecto a la gravedad de la enfermedad se produjeron al 5° día de evolución del brote, siendo los niveles de IL2, IL4, IFN γ y TNF α , en linfocitos CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ superiores en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG, mientras que los niveles de IL10 en ambas subpoblaciones de linfocitos y de IL6 en linfocitos CD3+CD45RO+ fueron mayores

en pacientes graves respecto a leves. Es interesante destacar que los niveles de IL4 en linfocitos CD3+CD45RO+ de pacientes con PAL fueron superiores a los pacientes con PAG tanto al inicio del brote como durante su evolución (Tabla 8.1.1. y 8.1.2.).

Tabla 8.1.2.: Expresión de citoquinas intracelulares, tras estimulación con pma-ionomicina, en linfocitos T CD3+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CD3+CD45RO+ IL2+	38.28 (33.69-39.85)	PAL	41.87 (35.60-42.95)	p<0.05 33.35 ^b (31.20-35.65)	p<0.05 49.99 ^{a,c} (45.61-52.70)
		PAG	39.80 ^a (37.81-44.25)	p<0.05 38.64 ^d (34.69-40.55)	37.82 (34.05-44.90)
CD3+CD45RO+ IL4+	2.44 (1.93-3.01)	PAL	6.10 ^{a,c} (5.40-6.37)	p<0.05 4.12 ^{a,d} (3.52-4.44)	p<0.05 4.83 ^{a,c} (4.56-6.22)
		PAG	3.14 ^b (2.76-3.46)	3.23 ^a (2.90-4.02)	3.61 ^a (3.42-4.07)
CD3+CD45RO+ IL6+	1.15 (0.72-1.56)	PAL	1.67 ^b (1.29-2.11)	2.00 ^a (1.90-2.38)	p<0.05 0.85 (0.82-0.94)
		PAG	1.84 ^a (1.64-2.34)	2.20 ^a (1.55-2.83)	p<0.05 1.57 ^{b,c} (1.34-1.67)
CD3+CD45RO+ IL10+	1.04 (0.73-1.53)	PAL	1.29 (1.21-1.35)	p<0.05 0.84 (0.78-0.89)	p<0.05 1.18 (1.11-1.27)
		PAG	1.16 (0.82-1.30)	0.91 (0.60-1.15)	p<0.005 1.76 ^{a,c} (1.42-1.97)
CD3+CD45RO+ IFNγ+	42.47 (39.24-47.97)	PAL	43.00 (41.54-45.12)	p<0.05 41.20 ^d (35.72-44.51)	37.91 ^c (36.09-45.42)
		PAG	40.97 (38.81-46.31)	p<0.005 34.93 ^a (33.14-38.20)	p<0.05 33.28 ^a (28.26-35.64)
CD3+CD45RO+ TNFα+	38.71 (34.05-40.51)	PAL	40.02 (37.72-45.67)	p<0.05 33.26 ^b (31.47-35.17)	30.30 ^{b,d} (27.72-37.86)
		PAG	36.69 (34.56-43.01)	33.05 (31.21-40.47)	p<0.005 24.86 ^a (20.01-28.49)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

8.2. Aumento de IL4 e IL6, y disminución de IL10 e IFN γ en linfocitos CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+ de pacientes con PAL, y disminución de citoquinas intracelulares en linfocitos CD8+CD45RO+ de pacientes con PAG.

El estudio de la producción de citoquinas intracelulares en las subpoblaciones de linfocitos T memoria/efectores CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+ reveló un incremento de los niveles de IL4 e IL6 y una disminución de IL10 e IFN γ , en ambas subpoblaciones de pacientes con PAL respecto a valores control al inicio del brote, así mismo se observó un incremento de IL2 en linfocitos CD8+CD45RO+ en este grupo de pacientes. Con la evolución del brote únicamente se normalizaron los niveles de IFN γ en linfocitos CD4+CD45RO+, también se produjo una disminución de TNF α en ambas subpoblaciones que se incrementó al 5° día en linfocitos CD8+CD45RO+, y una disminución de IL6 en esta subpoblación en ese mismo punto (Tabla 8.2.1. y figuras 8.2.1. y 8.2.2.).

Tabla 8.2.1.: Expresión de citoquinas intracelulares, tras estimulación con pma+ionomicina, en linfocitos T CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

Citoquinas	CD4+CD45RO+					CD8+CD45RO+				
	CS	Pacientes	Tiempo de evolución			CS	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días			basal	48 horas	5 días
IL2	43.24	PAL	50.22	36.98 ^a	43.61	17.35	PAL	20.59 ^{b,d}	22.92 ^a	25.91 ^{a,c}
		PAG	45.89	47.29 ^c	45.76		PAG	13.15	17.59	14.83 ^b
IL4	4.53	PAL	6.13 ^{a,c}	4.19	4.21	3.68	PAL	5.69 ^{a,c}	4.41 ^c	7.29 ^{a,c}
		PAG	4.06	4.22	4.44		PAG	2.86 ^a	2.33 ^a	2.00 ^a
IL6	1.45	PAL	3.31 ^{a,c}	2.75 ^{a,d}	2.30 ^a	2.33	PAL	3.33 ^{a,c}	2.49	1.63 ^b
		PAG	1.85 ^b	1.31	1.75 ^b		PAG	1.65 ^a	1.87 ^a	1.70 ^a
IL10	2.14	PAL	1.61 ^{b,d}	1.76	1.30 ^a	2.99	PAL	1.80 ^a	1.67 ^a	2.38 ^{a,c}
		PAG	1.29 ^a	1.60 ^b	1.67 ^c		PAG	2.34 ^{a,c}	1.34 ^a	1.66 ^a
IFN γ	35.63	PAL	26.86 ^a	35.44 ^c	32.20 ^c	74.96	PAL	62.47 ^a	60.43 ^a	63.75 ^a
		PAG	30.64 ^a	24.65 ^a	25.32 ^a		PAG	70.32 ^d	72.40 ^c	62.74 ^a
TNF α	37.15	PAL	37.00	29.66 ^a	32.30 ^a	29.33	PAL	29.24	23.16 ^b	33.74 ^{a,c}
		PAG	43.05 ^{a,c}	36.67 ^c	32.40 ^a		PAG	29.57	28.68	20.60 ^a

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

En pacientes con PAG, la producción de citoquinas fue menor, en términos generales, respecto a los valores control, se observó una disminución de IL4, IL6 e IL10 en linfocitos CD8+CD45RO+ al inicio y durante el brote inflamatorio, y de IL2, IFN γ y TNF α al 5° día de evolución. En linfocitos CD4+CD45RO+ se produjo una disminución de IL10 e IFN γ y un aumento de IL6 y TNF α , normalizándose los niveles de IL10 y disminuyendo los niveles de TNF α al 5° día.

Apenas se produjo modulación significativa en la producción de citoquinas por ambas subpoblaciones de linfocitos T memoria/efectores durante el brote, aunque hay una tendencia a la disminución de los niveles a las 48 horas seguido de un aumento al 5° día en pacientes leves.

Cuando se analizó comparativamente la producción de citoquinas entre ambos grupos de pacientes se observó un aumento de los niveles de IL4, IL6, IL10 e IFN γ , y una disminución de los niveles TNF α en linfocitos CD4+CD45RO+ de pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG al inicio del brote, pero con la evolución del mismo los niveles de IL4, IL6 y TNF α se equipararon mientras que los de IL10 aumentaron en pacientes graves respecto a leves. En la subpoblación CD8+CD45RO+ los niveles de IL2, IL4 e IL6 fueron superiores mientras que los de IL10 e IFN γ fueron inferiores, en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG al inicio del brote, aunque en las primeras 48 horas se equiparon transitoriamente los niveles de IL2 e IL10, al 5° día de evolución del brote únicamente los niveles de IL6 e IFN γ fueron similares mientras que el resto de citoquinas estudiadas mostraron niveles superiores en pacientes leves respecto a pacientes graves (**Tabla 8.2.1. y figuras 8.2.1. y 8.2.2.**).

Figura 8.2.1.: Expresión de citoquinas intracelulares en linfocitos T CD4+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con PA.

♣ p<0.05 y ‡ p<0.005 diferencias significativas entre PAL y PAG

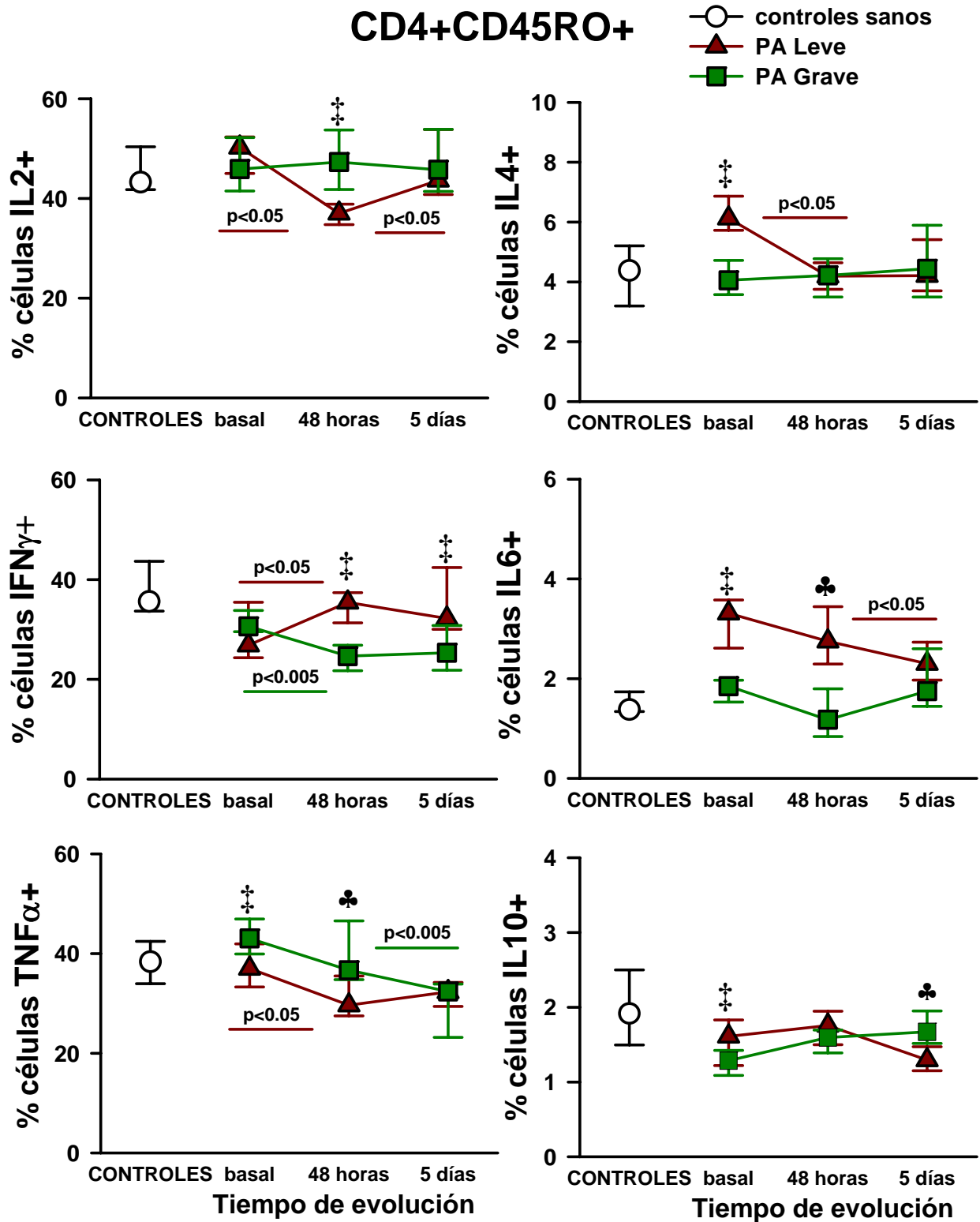
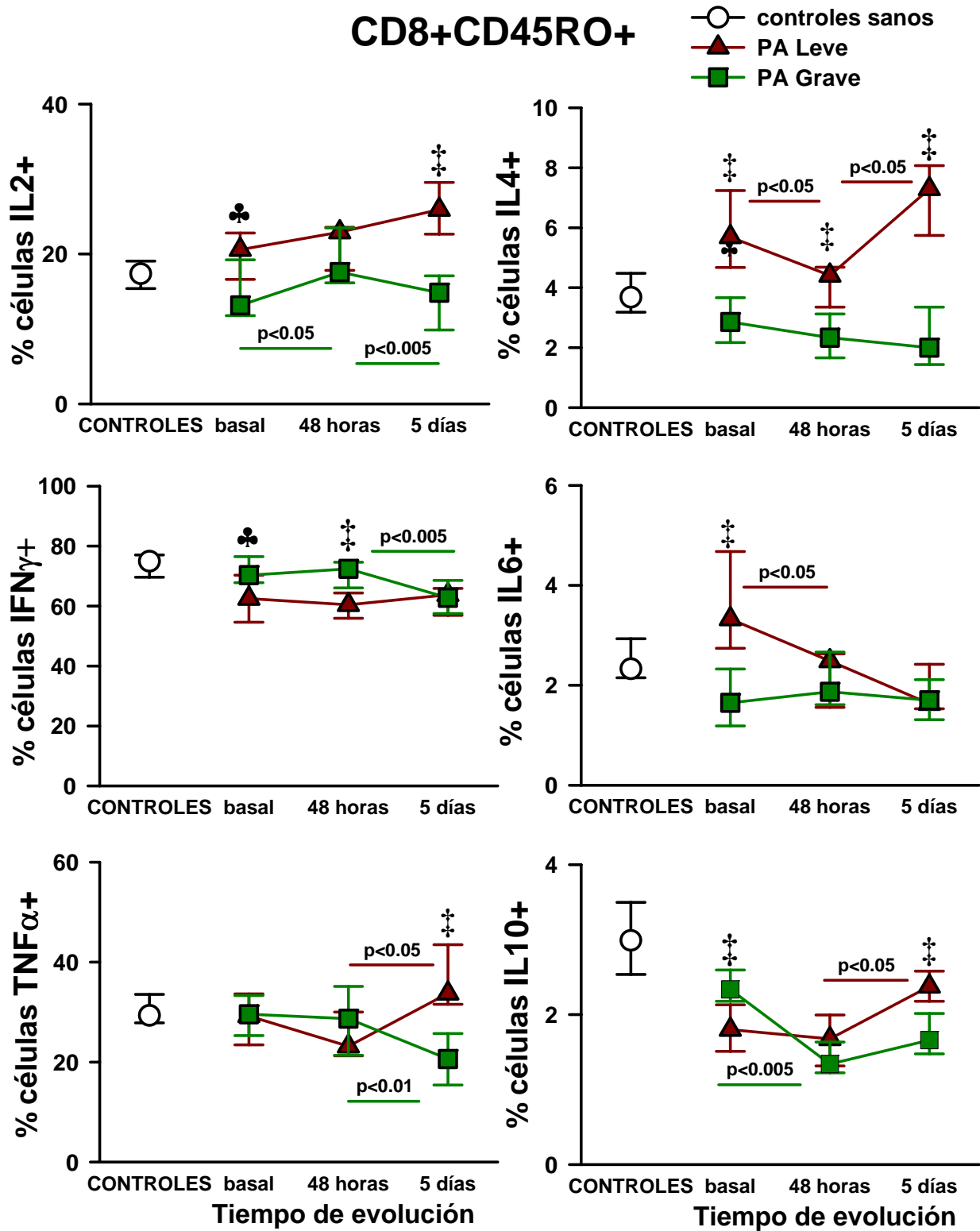


Figura 8.2.2.: Expresión de citoquinas intracelulares en linfocitos T CD8+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con PA.

♣ $p < 0.05$ y ‡ $p < 0.005$ diferencias significativas entre PAL y PAG



9. Apoptosis en linfocitos T

9.1. Aumento de la apoptosis espontánea en linfocitos CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+, y resistencia a la inducción de apoptosis en linfocitos CD3+CD45RO+.

Estudiamos la apoptosis espontánea, sin someter a ningún estímulo, y tras cultivar las células 24 horas en presencia de PHA, un activador policlonal de linfocitos, y estaurosporina, un potente inductor de apoptosis, en linfocitos naïve CD3+CD45RA+ y memoria/efectores CD3+CD45RO+ de pacientes con PA en el momento de la admisión hospitalaria y durante el brote inflamatorio. En los resultados obtenidos de la apoptosis espontánea aplicaremos el índice de apoptosis (AI), porcentaje de células apoptóticas respecto del total de células, mientras que en los obtenidos del cultivo celular aplicaremos el índice de apoptosis (AI) y el ratio de apoptosis (AR) que tiene en cuenta el número de células que mueren en el cultivo (ver materiales y métodos).

Tanto los linfocitos CD3+CD45RA+ como los CD3+CD45RO+ de ambos grupos de pacientes sufrieron mayor *apoptosis espontánea* respecto a controles sanos al inicio del brote, pero mientras los índice de apoptosis se mantuvieron por encima de los valores control durante todo el brote en la subpoblación CD3+CD45RA+, el AI de la subpoblación CD3+CD45RO+ disminuyó significativamente a las 48 horas de evolución en los pacientes con PAG y al 5° día en los pacientes con PAL. Los pacientes leves mostraron un incremento transitorio del AI a las 48 horas seguido de un descenso al 5° día en linfocitos CD3+CD45RA+ y un incremento progresivo en linfocitos CD3+CD45RO+. Por el contrario en los pacientes graves el incremento transitorio del AI se produjo en las subpoblación CD3+CD45RO+ mientras que la subpoblación CD3+CD45RA+ experimentó un descenso progresivo. El estudio comparativo entre ambos grupos de pacientes mostró resultados inversos en las subpoblaciones estudiadas, mientras que los pacientes con PAG mostraron un aumento del AI en linfocitos CD3+CD45RA+ al inicio del brote respecto a pacientes con PAL, seguido de una disminución transitoria a las 48 horas y un incremento al 5° día, en los linfocitos CD3+CD45RO+ son los pacientes leves los que experimentaron un AI superior al inicio respecto a pacientes graves seguido de la disminución a 48 horas y el incremento a 5° día (**Tabla 9.1.1.**).

El cultivo de linfocitos en *ausencia de estímulos* (medio) mostró un AI mayor respecto a valores control en linfocitos CD3+CD45RA+ en ambos grupos de pacientes al inicio y durante el brote, sin embargo observamos disminución del AR en ambas subpoblaciones en la

mismas condiciones. Igualmente los pacientes con PAL mostraron un aumento del AI pero una disminución del AR respecto a pacientes graves. Por otro lado, en los linfocitos CD3+CD45RO+ de pacientes con PAL tanto el AI como el AR fue inferior en ausencia de estímulos respecto a valores control, mientras que en los pacientes con PAG se produjo de nuevo un aumento de AI y una disminución de AR, normalizándose el AI al 5° día de evolución. Tanto el AI como el AR fue superior en pacientes graves respecto a leves con una equiparación temporal de los valores de AR a 48 horas (**Tabla 9.1.1. y 9.1.2.**).

Tras la *activación in vitro* con PHA, los linfocitos CD3+CD45RA+ de pacientes con PAL mostraron un incremento tanto del AI como del AR respecto a controles sanos al inicio del brote, pero mientras que los valores de AR se normalizaron a las 48 horas de evolución, los valores de AI se mantuvieron por encima de los valores control al 5° día tras una normalización transitoria a 48 horas. En los pacientes con PAG observamos el mismo comportamiento que en ausencia de estímulo, un aumento del AI y una disminución del AR respecto a valores control aunque en este caso el AI disminuyó al 5° día de evolución. En los linfocitos CD3+CD45RO+ se produjo un aumento de AI y AR en ambos grupos de pacientes, aunque en pacientes leves el AI aumentó puntualmente a las 48 horas de evolución. En los pacientes graves los niveles se normalizaron al 5° día mientras que en los pacientes leves se produjo una disminución del AR. La modulación de los niveles de apoptosis no sigue un patrón concreto durante el brote, pero observamos un predominio del descenso tanto del AI como del AR en ambas subpoblaciones y grupos de pacientes. Aunque los pacientes con PAG mostraron un AI y AR superior en linfocitos CD3+CD45RA+ respecto a pacientes con PAL al inicio del brote, esta relación se invierte con la evolución del brote. En los linfocitos CD3+CD45RO+ el AI fue mayor en pacientes graves respecto a leves al inicio del brote, equiparándose los niveles al 5° día de evolución, pero no observamos diferencias en el AR (**Tabla 9.1.1. y 9.1.2. y figura 9.1.1.**).

La *inducción de apoptosis* mediante *estaurosporina* reveló un incremento del AI y un aumento puntual del AR a las 48 horas respecto a valores control en linfocitos CD3+CD45RA+ de pacientes con PAL, mientras que en pacientes con PAG observamos una disminución del AI y un aumento del AR que disminuye al 5° día de evolución. Sin embargo, los linfocitos CD3+CD45RO+ no mostraron diferencias respecto a controles al inicio del brote pero durante la evolución del mismo se produjo una disminución tanto del AI como del AR en ambos grupos de pacientes. El AI y AR en ambas subpoblaciones fue superior en pacientes con PAL

respecto a pacientes con PAG aunque las diferencias, al inicio y durante el brote, son mayores en el AI y en linfocitos CD3+CD45RA+. En general la modulación durante el brote sigue un patrón en V, con un descenso a las 48 horas de evolución seguido de un aumento al 5° día. (Tabla 9.1.1. y 9.1.2. y figura 9.1.1.)

Tabla 9.1.1.: Índice de apoptosis (AI) en linfocitos T CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

ESTÍMULOS	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución			
			basal	48 horas	5 días	
CD3+CD45RA+						
espontánea	3.92 (3.60-5.36)	PAL	5.73 ^a (4.47-6.46)	5.43 ^b (4.49-7.18)	p<0.05	8.87 ^{a,d} (7.09-10.75)
		PAG	5.13 (4.38-5.84)	5.61 ^a (5.35-6.26)	p<0.05	7.05 ^a (5.83-8.09)
medio	2.61 (2.35-3.27)	PAL	3.52 ^b (3.06-4.19)	3.86 ^a (3.51-3.91)		3.87 ^a (3.48-4.88)
		PAG	7.43 ^{a,c} (6.69-8.36)	4.17 ^a (3.72-5.60)	p<0.005	3.51 ^a (3.20-3.70)
pha 0.2%	6.13 (5.24-7.06)	PAL	11.33 ^a (10.66-13.15)	14.32 ^{a,c} (11.08-15.04)	p<0.05	12.52 ^{a,c} (10.80-13.77)
		PAG	15.59 ^{a,c} (14.13-18.91)	9.68 ^a (8.81-10.99)	p<0.005	4.62 ^a (3.22-5.47)
estaurosporina 5µM	68.46 (65.02-75.50)	PAL	80.72 ^{a,c} (76.33-85.30)	71.85 ^c (69.93-72.28)	p<0.05	82.6 ^{a,c} (77.72-87.73)
		PAG	67.08 (65.39-76.05)	53.13 ^a (48.50-56.07)	p<0.005	61.79 ^a (54.46-66.79)
CD3+CD45RO+						
espontánea	8.10 (6.77-10.15)	PAL	9.06 (8.95-10.38)	6.57 ^d (6.31-7.81)	p<0.05	5.44 ^a (5.18-7.12)
		PAG	10.00 ^b (8.68-11.76)	5.65 ^a (4.61-6.71)	p<0.005	7.17 ^d (6.37-8.96)
medio	6.92 (6.55-7.84)	PAL	4.69 ^a (4.08-5.60)	5.07 ^a (4.89-6.21)		4.97 ^a (4.17-5.90)
		PAG	7.86 ^{b,c} (6.95-9.09)	9.09 ^{a,c} (8.35-11.64)	p<0.05	6.37 ^{b,d} (5.44-8.28)
pha 0.2%	15.46 (13.46-17.05)	PAL	16.53 (15.01-17.27)	20.53 ^a (17.96-22.70)	p<0.05	14.43 (12.29-15.51)
		PAG	24.35 ^{a,c} (22.08-31.31)	24.59 ^{a,c} (23.10-25.92)	p<0.005	15.38 (13.76-19.23)
estaurosporina 5µM	85.75 (83.41-89.64)	PAL	87.73 (84.80-93.20)	58.13 ^a (55.55-63.95)	p<0.05	67.44 ^{a,d} (63.04-71.78)
		PAG	86.94 (83.68-89.63)	61.47 ^a (59.37-64.48)	p<0.005	59.76 ^a (55.01-63.68)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Tabla 9.1.2.: Ratio de apoptosis (AR) en linfocitos T CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

ESTÍMULOS	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución			
			basal	48 horas	5 días	
CD3+CD45RA+						
medio	37.01 (29.61-38.58)	PAL	21.15 ^a (14.41-23.67)	11.10 ^a (8.97-13.14)	p<0.05	7.00 ^a (6.00-7.46)
		PAG	15.10 ^a (12.06-20.38)	16.21 ^{a,c} (14.05-16.93)		18.19 ^{a,c} (13.37-28.76)
pha 0.2%	52.77 (43.69-53.44)	PAL	59.67 ^a (55.42-63.96)	62.82 ^{b,d} (51.34-64.53)	p<0.05	46.05 (43.36-53.92)
		PAG	64.62 ^{a,d} (62.56-68.67)	50.63 (43.58-54.74)	p<0.005	48.26 (43.18-51.20)
estaurosporina 5μM	90.60 (88.77-94.05)	PAL	94.49 ^b (91.42-96.39)	91.22 ^c (88.27-92.40)		94.61 ^{b,c} (91.72-96.08)
		PAG	91.58 (89.50-92.79)	70.17 ^a (55.30-75.89)	p<0.005	78.88 ^a (77.21-83.04)
CD3+CD45RO+						
medio	49.63 (42.52-53.97)	PAL	12.49 ^a (10.39-14.87)	19.59 ^a (18.35-25.55)	p<0.05	11.51 ^a (9.17-14.06)
		PAG	17.79 ^{a,c} (15.83-22.64)	20.94 ^a (12.79-22.59)	p<0.005	25.65 ^{a,c} (21.30-28.81)
pha 0.2%	68.99 (66.30-72.03)	PAL	75.11 ^a (73.20-81.37)	73.10 ^b (71.47-75.74)	p<0.05	56.92 ^a (54.66-64.06)
		PAG	77.95 ^a (75.26-85.37)	74.63 ^a (72.15-82.56)	p<0.005	68.81 (56.45-70.99)
estaurosporina 5μM	95.47 (93.88-96.80)	PAL	93.58 (92.49-95.85)	92.67 ^c (91.63-94.89)	p<0.05	87.18 ^{a,d} (85.69-88.22)
		PAG	94.77 (92.18-96.11)	62.41 ^a (48.62-65.94)	p<0.005	83.77 ^a (78.16-86.05)

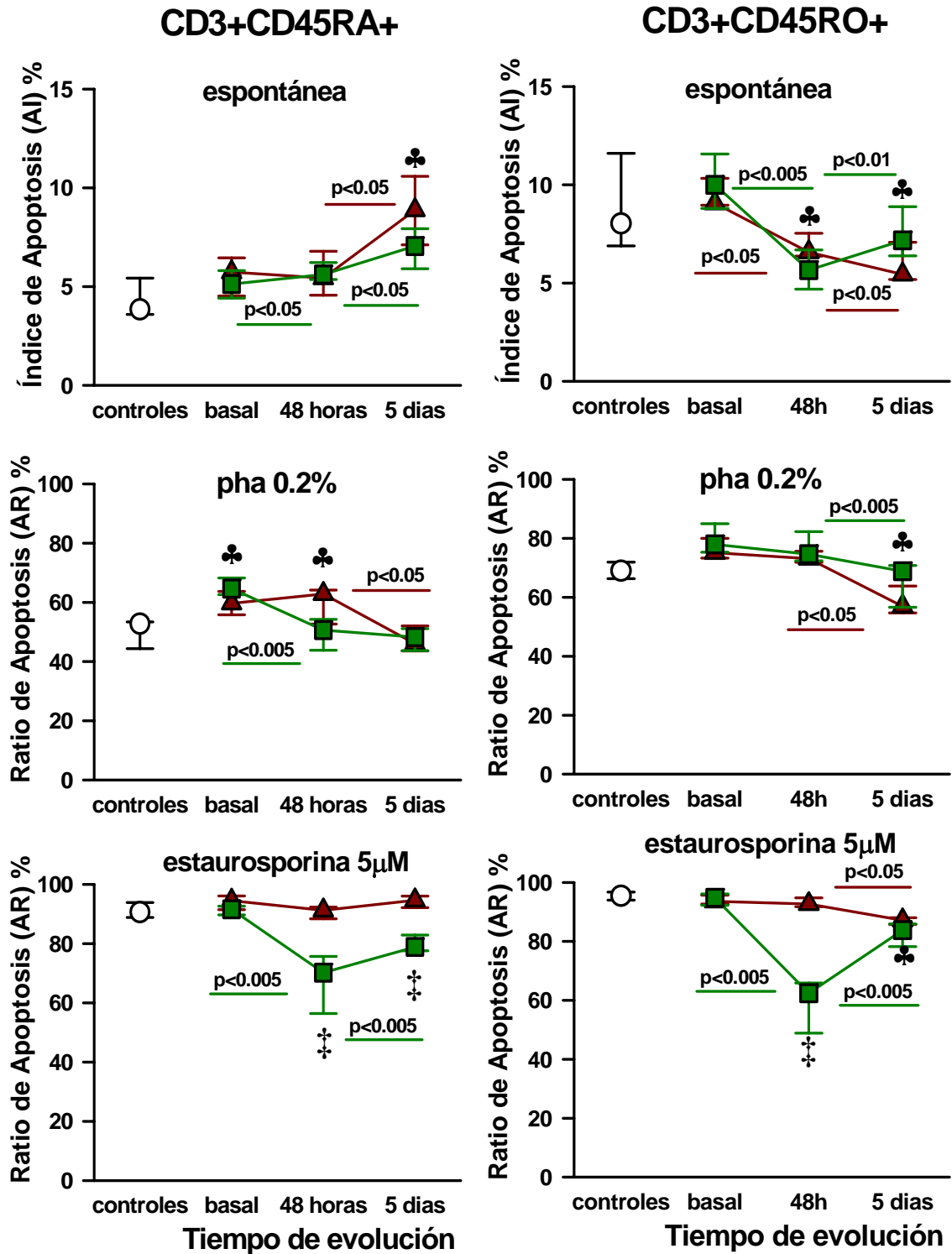
^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Figura 9.1.1.: Apoptosis espontánea (índice de apoptosis) y tras estimulación con pha 0.2% y estaurosporina 5 μ M (ratio de apoptosis) en linfocitos CD3+CD45RA+ y CD3+CD45RO+ de sangre periférica de pacientes con PA.

♣ $p < 0.05$ y ‡ $p < 0.005$ diferencias significativas entre PAL y PAG



10. Estudio fenotípico y funcional de monocitos

10.1. Incremento de CD80, CD40, HLA-DR y CD62L en monocitos de pacientes con PAL y disminución de HLA-DR en monocitos de pacientes con PAG. Niveles de expresión significativamente superiores en pacientes leves respecto a graves.

Estudiamos la expresión de marcadores de activación en monocitos de pacientes con PA, que incluyen la molécula de MHC II (HLA-DR), moléculas coestimuladoras de linfocitos (CD80 y CD40) y la molécula de adhesión (CD62L). Observamos un incremento generalizado de estos marcadores en monocitos de pacientes con PAL al inicio del brote respecto a controles sanos, que se mantuvo sin cambios con la evolución del episodio inflamatorio, con excepción del HLA-DR que disminuyó respecto a valores control al 5° día. Sin embargo, los pacientes con PAG mostraron una disminución de CD80 y HLA-DR, y un incremento de CD62L respecto a controles sanos en el momento de su admisión hospitalaria, la expresión de CD40 no mostró diferencias respecto a valores control en este punto. La evolución del brote no provocó cambios en la expresión de HLA-DR en estos pacientes, mientras que los niveles de CD62L se normalizaron y los niveles de CD80 se incrementaron, tras una normalización transitoria a las 48 horas, al 5° día de evolución. También se observó una disminución de CD40 a las 48 horas de evolución que retornó a los valores control al 5° día.

Cuando se analizó la cinética de expresión de marcadores de activación a lo largo del episodio inflamatorio, se observaron variaciones puntuales en pacientes leves, los niveles de CD62L y CD40 disminuyeron y se incrementaron respectivamente a las 48 horas mientras que los niveles de HLA-DR y CD80 siguieron el mismo patrón al 5° día. Por otro lado, en los pacientes graves se produjo un incremento progresivo de los niveles de CD80 y HLA-DR, y una disminución de los niveles CD62L y CD40 a las 48 horas. Los niveles de CD40 se incrementaron de nuevo al 5° día.

Los pacientes con PAL mostraron niveles de expresión de estos marcadores significativamente superiores a los observados en pacientes con PAG al inicio y durante el brote, con excepción de CD62L cuyos niveles al inicio del brote fueron similares en ambos grupos de pacientes para luego diferenciarse durante el episodio inflamatorio (**Tabla 10.1.1. y figura 10.1.1.**).

Los pacientes con PA presentan monocitosis, más acusada en pacientes graves respecto a leves, por ello el estudio del número de células muestra algunas diferencias

respecto al estudio relativo de la expresión de estos marcadores. Los pacientes con PAL mostraron un incremento del número de monocitos CD14+CD80+ y CD14+CD40+ al inicio y durante el brote respecto a controles sanos, mientras que el número de monocitos CD14+CD62L+ únicamente se incrementó al inicio del brote para normalizarse a las 48 horas, y el número de CD14+HLA-DR+ no experimentó cambios. En los pacientes con PAG observamos resultados similares a los obtenidos en el estudio de porcentaje, el número de CD14+HLA-DR+ y CD14+CD62L+ disminuyó y se incrementó respectivamente respecto a valores control al inicio y durante del brote, con una normalización del número de CD14+HLA-DR+ al 5° día, mientras que el número de CD14+CD80+ y CD14+CD40+ se incrementó puntualmente al 5° día de evolución.

No se observaron cambios significativos en el número de monocitos que expresan estos marcadores en pacientes con PA durante el brote inflamatorio, con excepción de un incremento progresivo del número de monocitos CD14+CD80+ en pacientes con PAG. Igualmente las marcadas diferencias observadas entre ambos grupos de pacientes en el estudio del porcentaje de expresión desaparecen cuando estudiamos el número de células, únicamente el número de CD14+CD80+ y CD14+HLA-DR+ fue superior al inicio del brote y de CD14+CD40+ a las 48 horas de evolución del mismo, en pacientes leves respecto a graves (Tabla 10.1.1. y figura 10.1.1.).

Tabla 10.1.1.: Distribución y número de monocitos CD14+CD80+, CD14+HLA-DR+, CD14+CD62L+ y CD14+CD40+ de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

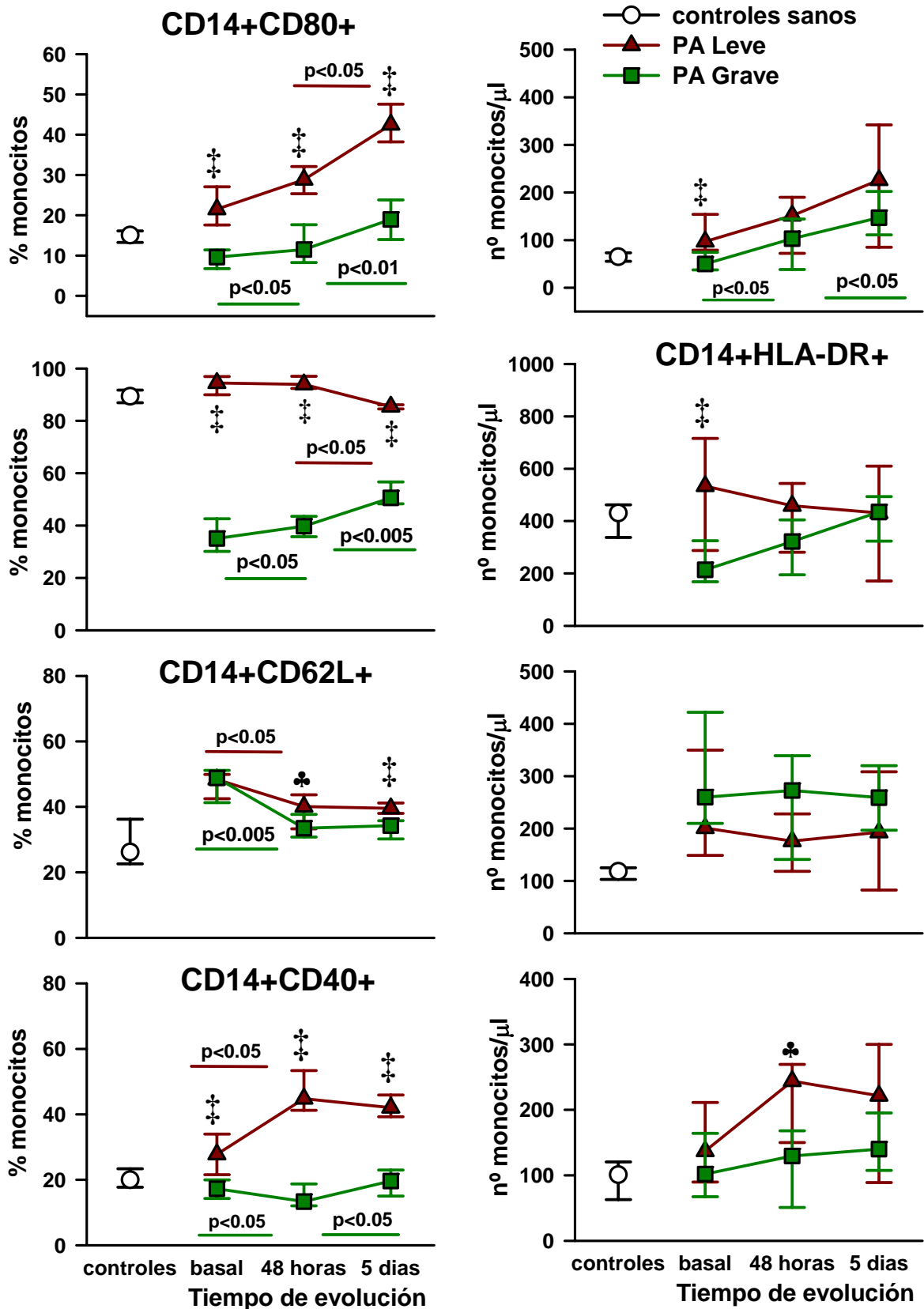
	%					N° células / μ l				
	CS	Pacientes	Tiempo de evolución			CS	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días			basal	48 horas	5 días
CD14+	15.07	PAL	21.49 ^{a,c}	28.82 ^{a,c}	42.51 ^{a,c}	65	PAL	97 ^{a,c}	151 ^b	226 ^a
CD80+		PAG	9.61 ^a	11.52	18.95		PAG	50	103	147 ^a
CD14+	89.34	PAL	94.47 ^{b,c}	93.93 ^{a,c}	85.41 ^{a,c}	430	PAL	534 ^c	458	431
HLA-DR+		PAG	35.05 ^a	39.77 ^a	50.55 ^a		PAG	214 ^a	322 ^a	435
CD14+	26.17	PAL	48.36 ^a	40.09 ^{b,d}	39.53 ^{a,c}	118	PAL	201 ^a	176	193
CD62L+		PAG	48.82 ^a	33.49 ^b	34.25		PAG	260 ^a	273 ^b	259 ^a
CD14+	20.02	PAL	27.78 ^{b,c}	44.80 ^{a,c}	42.04 ^{a,c}	101	PAL	137 ^b	244 ^{a,d}	222 ^b
CD40+		PAG	17.27	13.35 ^b	19.62		PAG	102	129	140 ^b

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Figura 10.1.1.: Porcentaje y n° de monocitos CD14+CD80+, CD14+HLA-DR+, CD14+CD62L+ y CD14+CD40+ en sangre periférica de pacientes con PA.

* $p < 0.05$ y † $p < 0.005$ diferencias significativas entre PAL y PAG



10.2. Incremento de la expresión de CCR2, CCR6, CXCR3 y CXCR4 en monocitos CD14+. Incremento del número de monocitos que expresan QRs en pacientes con PAG

Los pacientes con PA mostraron un incremento de la expresión de CCR2, CCR6, CXCR3 y CXCR4 respecto a controles sanos sin diferencias en función de la gravedad de la enfermedad, los niveles no se normalizaron con la evolución del brote, con excepción de la expresión de CCR2 en pacientes con PAG. Por el contrario, no observamos cambios en la expresión de CCR5 en pacientes con PAL, excepto un incremento puntual al 5° día de evolución del brote, mientras que en pacientes con PAG los niveles fueron menores respecto a valores control. Los niveles de expresión de QRs tienden a incrementarse progresivamente con la evolución del brote en ambos grupos de pacientes aunque observamos descensos puntuales de CXCR4 y CCR2 al 5° día en pacientes graves (Tabla 10.2.1.).

Tabla 10.2.1.: Porcentaje de monocitos que expresan CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR4 en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CCR2	85.52 (78.92-89.02)	PAL	89.43 ^b (84.08-95.13)	95.80 ^a (91.46-99.45)	92.61 ^a (86.98-95.81)
		PAG	97.59 ^a (86.67-98.73)	93.55 ^a (89.96-96.06)	87.27 (82.71-91.61)
CCR5	83.97 (81.86-90.32)	PAL	85.94 ^c (81.59-89.47)	86.54 (84.04-89.31)	89.49 ^{b,c} (88.18-92.17)
		PAG	78.49 ^a (72.77-81.36)	87.48 (84.26-91.95)	76.79 ^a (74.07-80.60)
CCR6	3.65 (3.01-4.89)	PAL	6.59 ^a (5.37-7.61)	8.72 ^{a,c} (8.24-9.31)	10.05 ^{a,b} (8.95-11.84)
		PAG	5.51 ^a (4.92-6.01)	6.16 ^a (5.68-6.79)	7.90 ^a (6.00-9.73)
CXCR3	5.40 (3.72-6.37)	PAL	8.00 ^{a,d} (6.46-8.43)	12.32 ^a (10.56-15.33)	14.72 ^{a,c} (11.84-15.43)
		PAG	9.09 ^a (7.13-9.42)	11.13 ^a (8.61-12.43)	16.53 ^a (15.52-19.64)
CXCR4	60.33 (56.14-64.29)	PAL	89.66 ^a (85.32-91.94)	78.33 ^{a,c} (76.32-82.94)	89.92 ^{a,c} (85.57-95.10)
		PAG	94.59 ^a (83.37-96.44)	92.22 ^a (89.09-93.35)	68.06 ^a (65.16-78.09)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

Los pacientes con PAL mostraron un incremento de CCR5 y CCR6 respecto a pacientes con PAG, mientras que en los pacientes graves los niveles de CXCR3 y CXCR4 fueron superiores a los observados en pacientes leves al inicio del brote y a las 48 horas respectivamente (Tabla 10.2.1).

El estudio del número de células reveló un incremento generalizado del número de monocitos que expresan QRs en ambos grupos de pacientes al inicio del brote, con excepción del número de CD14+CCR5+ que fue similar al observado en controles sanos. En pacientes con PAG, el número de CD14+CCR5+ se incrementó a las 48 horas de evolución del brote y el número de monocitos que expresan QR se mantuvo por encima de los valores control durante todo el episodio inflamatorio, mientras que en pacientes con PAL el número de monocitos CD14+CCR6+ y CD14+CXCR3+ se mantuvo sin cambios y el número de CD14+CCR2+ y CD14+CXCR4+ se normalizó a las 48 horas (Tabla 10.2.2).

Tabla 10.2.2.: Número de monocitos (células/ μ l) que expresan CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR4 en sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	Controles sanos	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días
CCR2	406 (369-437)	PAL	489 ^b (287-678)	459 (244-555)	435 (183-676)
		PAG	495 ^a (403-800)	739 ^a (398-984)	716 ^{a,d} (504-860)
CCR5	411 (380-440)	PAL	475 (285-638)	425 (215-502)	422 (179-662)
		PAG	415 (353-732)	683 ^a (377-964)	688 ^a (452-710)
CCR6	17 (10-24)	PAL	41 ^b (16-61)	44 ^b (21-54)	55 ^b (18-86)
		PAG	33 ^a (27-44)	43 ^a (28-70)	54 ^a (49-79)
CXCR3	22 (18-32)	PAL	43 ^a (25-57)	53 ^a (36-86)	69 ^a (29-100)
		PAG	46 ^a (34-83)	79 ^a (33-112)	145 ^{a,d} (92-196)
CXCR4	293 (258-320)	PAL	512 ^a (285-667)	405 (197-447)	447 (177-731)
		PAG	485 ^a (442-747)	723 ^{a,d} (396-962)	576 ^a (417-711)

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

Las “p” entre los tiempos de evolución del brote dentro de cada grupo de pacientes corresponden a la estadística pareada (Test de Wilcoxon)

De forma similar a los datos obtenidos en el estudio de marcadores de activación, apenas se observó modulación en el número de monocitos que expresan QRs durante el brote inflamatorio, con excepción de un incremento progresivo del número de CD14+CXCR3+ en pacientes con PAG. Igualmente, no hubo diferencias destacables en función de la gravedad de la enfermedad (**Tabla 10.2.2.**).

10.3. Disminución de IL6, TNF α e IL1 β , en pacientes con PAG en ausencia de estimulación y en pacientes con PAL y PAG tras estimulación con pma+ionomicina. Incremento de la expresión de citoquinas intracelulares en pacientes leves respecto a graves.

Estudiamos la expresión intracelular de IL6, TNF α e IL1 β por monocitos de pacientes con PA sin estimulación (producción basal) y tras estimulación durante 6 horas con pma+ionomicina. Tanto en ausencia de estimulación como tras estimulación con pma+ionomicina, los monocitos de pacientes con PAG produjeron niveles marcadamente inferiores de IL6, TNF α e IL1 β respecto a monocitos de controles sanos. Únicamente la producción basal de TNF α e IL1 β se normalizó al 5° día de evolución del brote. Por el contrario en pacientes con PAL no se observaron diferencias destacables en la producción basal, excepto una disminución de la expresión de IL6, y aunque, tras estimulación con pma+ionomicina, se produjo una disminución de citoquinas respecto a valores control al inicio del brote, durante la evolución del mismo los niveles de IL6 se normalizaron a las 48 horas y los de TNF α se incrementaron al 5° día.

El patrón de expresión de citoquinas durante el brote inflamatorio varía en función de la citoquina y la ausencia o presencia de estimulación, pero en pacientes con PAL predomina la disminución de la producción basal y el incremento de los niveles tras estimulación con pma+ionomicina, mientras que en pacientes con PAG se produce un incremento de la producción basal y una disminución de los niveles de citoquinas tras estimulación. Las mayores diferencias entre ambos grupos de pacientes se produjeron a las 48 horas de evolución del brote, tanto en ausencia como en presencia de estimulación los monocitos de pacientes con PAL produjeron niveles significativamente mayores de citoquinas respecto a la producción en monocitos de pacientes con PAG, sin embargo mientras que la producción basal se equiparó al 5° día, la producción tras estimulación continuó siendo superior en pacientes leves respecto a graves (**Tabla 10.3.1. y figura 10.3.1.**)

Figura 10.3.1.: Expresión de citoquinas intracelulares, IL6, TNF α e IL1 β , en monocitos de sangre periférica de pacientes con PA.

♣ $p < 0.05$ y ‡ $p < 0.005$ diferencias significativas entre PAL y PAG

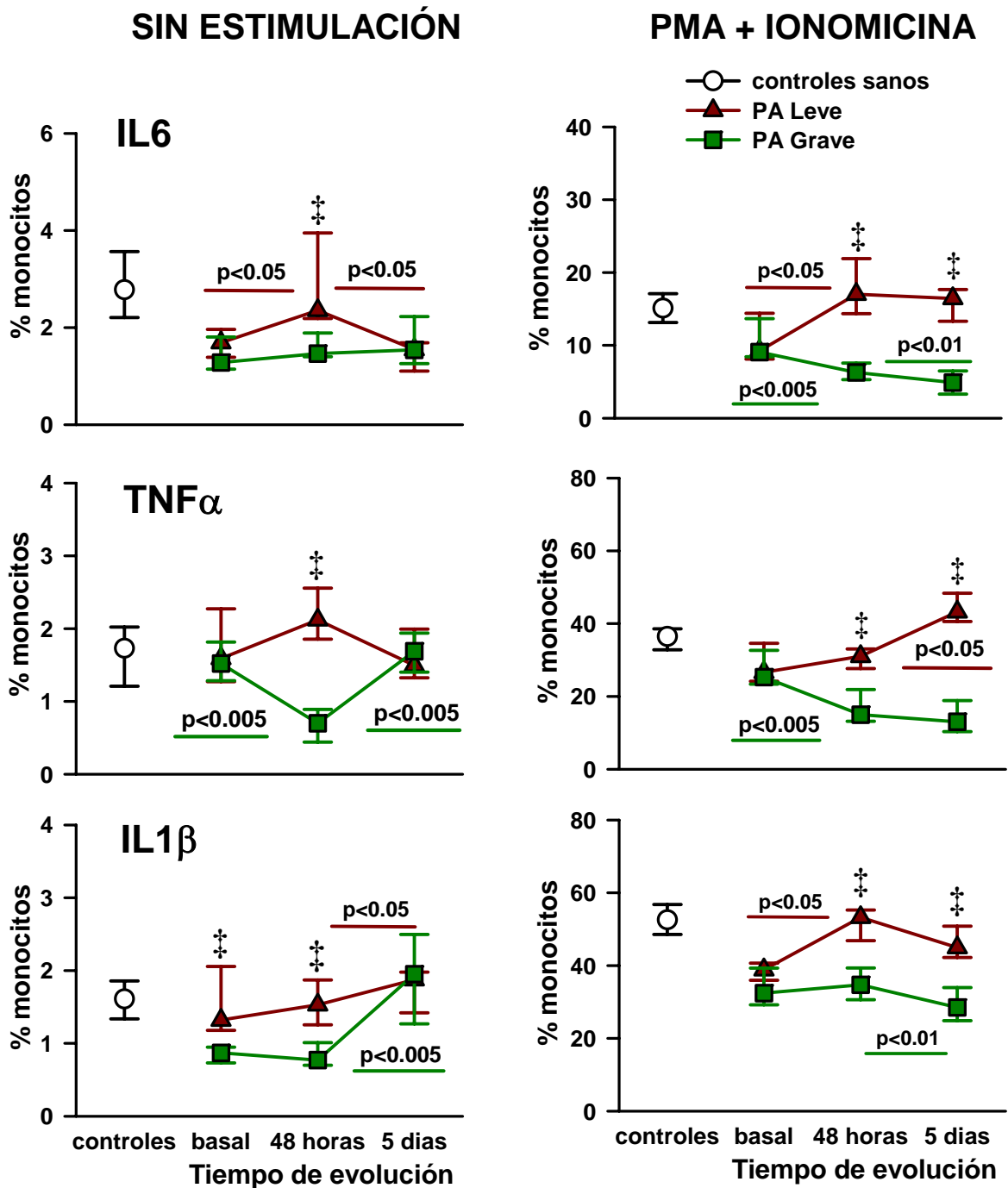


Tabla 10.3.1.: Expresión de IL1 β , IL6 y TNF α , sin estimulación y tras estimulación con pma+ionomicina, en monocitos de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25-percentil 75)

	sin estimulación					pma+ionomicina				
	CS	Pacientes	Tiempo de evolución			CS	Pacientes	Tiempo de evolución		
			basal	48 horas	5 días			basal	48 horas	5 días
IL1β	1.61	PAL	1.32 ^c	1.53 ^c	1.88	52.58	PAL	38.86 ^a	53.26 ^c	44.94 ^{b,c}
		PAG	0.87 ^a	0.77 ^a	1.95		PAG	32.43 ^a	34.72 ^a	28.50 ^a
IL6	2.78	PAL	1.69 ^a	2.35 ^c	1.55 ^a	15.10	PAL	9.23 ^b	17.03 ^c	16.44 ^c
		PAG	1.28 ^a	1.47 ^a	1.54 ^a		PAG	9.07 ^a	6.28 ^a	4.89 ^a
TNFα	1.73	PAL	1.59	2.12 ^{b,c}	1.50	36.44	PAL	26.63 ^b	31.02 ^{b,c}	43.22 ^{a,c}
		PAG	1.52	0.70 ^a	1.69		PAG	25.29 ^a	14.98 ^a	13.04 ^a

^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

10.4. Disminución de la capacidad fagocítica y de generación de radicales libres de óxido nítrico en pacientes con PAL y PAG e incremento de ambos parámetros en pacientes leves respecto a graves

Estudiamos la capacidad fagocítica y de generación de radicales libres de NO por monocitos en presencia de *E. coli*, obtenemos datos directos del porcentaje de monocitos que responden al estímulo y datos indirectos de la cantidad de *E. coli* fagocitada y de radicales de NO emitidos respectivamente, multiplicando el porcentaje de células positivas por la intensidad media de fluorescencia (mfi).

Los pacientes con PA, independientemente de la gravedad de la enfermedad, mostraron una drástica disminución de su capacidad fagocítica y de generación de radicales de NO respecto a controles sanos, al inicio y durante el brote inflamatorio. Así mismo, la cantidad de *E. coli* fagocitada y de radicales de NO emitidos también fue sensiblemente menor en todos los tiempos estudiados (**Tabla 10.4.1. y figura 10.4.1.**).

Con la evolución del brote, se observó un incremento progresivo tanto de la capacidad fagocítica como de la generación de radicales de NO en pacientes con PAL mientras que en pacientes con PAG se produjo el efecto contrario, un descenso progresivo de la capacidad fagocítica y una disminución al 5° día de la capacidad de generación de radicales de NO. Por otro lado los resultados sobre la cantidad de *E. coli* fagocitada y

cantidad de radicales emitidos, revelaron un incremento de ambos parámetros a 0 día, con una disminución transitoria de radicales de NO a 48 horas, en pacientes leves, y una disminución progresiva de la cantidad de *E. coli* fagocitada y un incremento de radicales a 48 horas en pacientes graves.

El estudio comparativo entre ambos grupos de pacientes mostró un marcado incremento tanto de la capacidad fagocítica como de la generación de radicales de NO en pacientes con PAL respecto a pacientes con PAG durante el episodio inflamatorio, aunque en el momento de la admisión hospitalaria no observamos diferencias en la capacidad de generación radicales. Igualmente la cantidad de *E. coli* fagocitada y de radicales emitidos fue mayor en pacientes leves respecto a pacientes graves al inicio y durante el brote inflamatorio (Tabla 10.4.1. y figura 10.4.1.).

Tabla 10.4.1.: Fagocitosis y generación de radicales libres de NO en presencia de *E.coli*, en monocitos de sangre periférica de pacientes con PA. Los datos representan mediana (percentil 25- percentil 75)

	controles sanos	Tiempo de evolución			
		basal	48 horas	5 días	
Capacidad fagocítica					
% monocitos	87.33 (84.18-90.48)	PAL	51.24 ^{a,c} (49.97-56.66)	62.69 ^{a,c} (59.77-66.91)	71.12 ^{a,c} (69.77-74.01)
		PAG	46.54 ^a (44.68-47.84)	36.92 ^a (34.69-38.89)	32.85 ^a (32.10-33.99)
% monocitos x mfi	34668 (29839-35307)	PAL	23871 ^{a,c} (18513-24306)	21694 ^{a,c} (20927-23343)	24348 ^{a,c} (21571-27198)
		PAG	16775 ^a (15654-17693)	13498 ^a (11400-14102)	10852 ^a (9563-11414)
Generación de radicales libres de NO					
% monocitos	77.86 (75.39-82.88)	PAL	32.68 ^a (30.76-37.16)	43.67 ^{a,c} (40.81-46.59)	50.54 ^{a,c} (49.00-53.01)
		PAG	33.85 ^a (32.29-37.18)	34.21 ^a (32.71-36.15)	32.98 ^a (30.69-36.42)
% monocitos x mfi	3301 (3163-3600)	PAL	1702 ^{a,c} (1531-1939)	1554 ^{a,c} (1368-1766)	1767 ^{a,c} (1469-1860)
		PAG	997 ^{a,c} (973-1206)	1081 ^{a,c} (949-1196)	1082 ^{a,c} (987-1207)

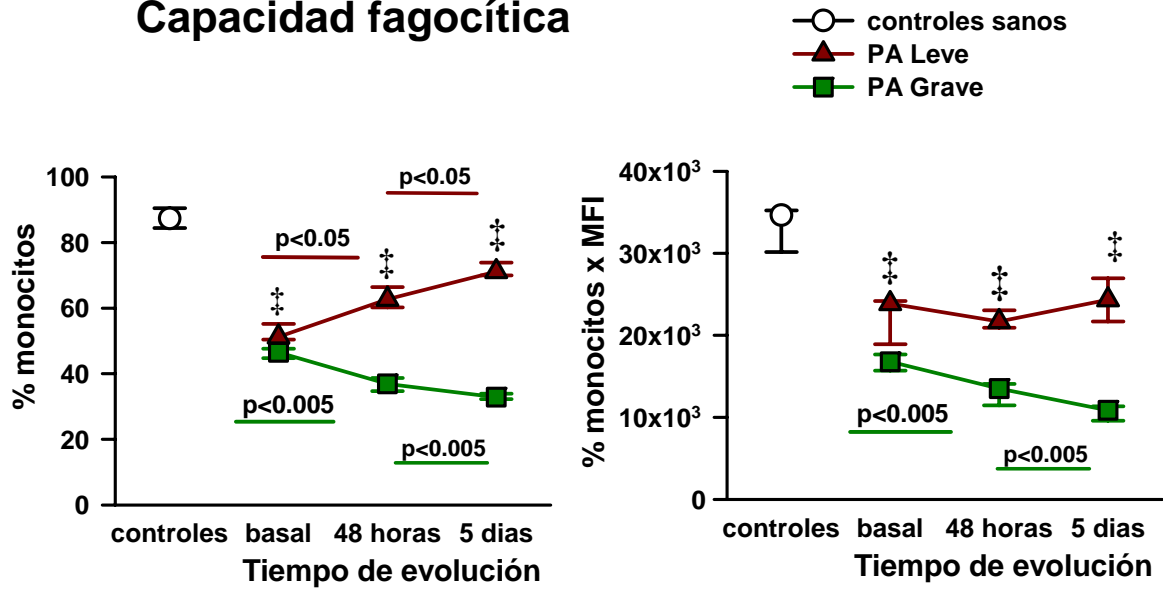
^a p<0.005 y ^b p<0.05 diferencias significativas entre pacientes y controles sanos

^c p<0.005 y ^d p<0.05 diferencias significativas entre pacientes con PAL y pacientes con PAG

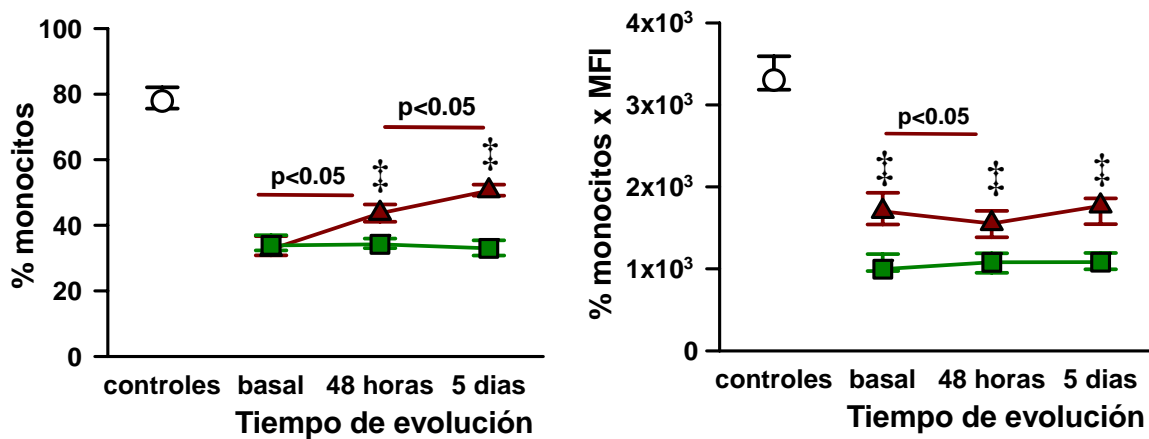
Figura 10.4.1.: Capacidad fagocítica y generación de radicales libres de óxido nítrico (NO), en presencia de *E. coli*, en monocitos de sangre periférica de pacientes con PA.

♣ $p < 0.05$ y ‡ $p < 0.005$ diferencias significativas entre PAL y PAG

Capacidad fagocítica



Generación de radicales libres de óxido nítrico (NO)



DISCUSIÓN

1. Introducción

La Pancreatitis aguda es una enfermedad inflamatoria de rápida evolución con expresión biológica y clínica sistémica de magnitud y gravedad variables. Hallazgos experimentales indican la implicación de linfocitos y monocitos en la respuesta inflamatoria local y extrapancreática observada en estos pacientes.

Sin embargo, la caracterización de las alteraciones fenotípicas de las diferentes poblaciones linfocitarias y monocitarias, con énfasis en la distribución de sus subpoblaciones, estado de activación, expresión de moléculas implicadas en su distribución tisular, así como de su capacidad efectora y reguladora medida por la síntesis de citoquinas, no ha sido caracterizada. Por lo tanto, en nuestro estudio se ha investigado la distribución y las características fenotípicas identificadoras del estado funcional de las principales poblaciones linfocitarias, células T, B y NK, y monocitarias en sangre periférica de pacientes con PA en las horas iniciales de la enfermedad, y su variación durante las fases agudas del proceso (5 días). Además, se analizaron las alteraciones encontradas en estos enfermos en función de la intensidad de la enfermedad clasificándolos como pacientes leves (PAL) y graves (PAG). Se emplearon para el estudio comparativo individuos sanos con similar edad y sexo a los del grupo de pacientes.

2. Análisis de la distribución y estado funcional de las poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda

Nuestros datos demuestran que en las fases iniciales de la PA se produce una clara neutrofilia, que es la principal responsable de la leucocitosis asociada a esta patología, y una linfopenia absoluta y relativa. Estos resultados coinciden con publicaciones previas realizadas en pacientes con PA y modelos experimentales (463-466). Hemos observado que estas anomalías leucocitarias son más acusadas en pacientes con PAG respecto a pacientes con PAL. Así mismo, en los pacientes graves se observa una monocitosis absoluta a las 48 horas de evolución y la neutrofilia persiste a los 5 días. Asociado a este análisis investigamos específicamente el comportamiento de diferentes poblaciones linfocitarias.

En los pacientes con PA se observa, en el momento del ingreso hospitalario una clara disminución de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ con progresiva recuperación del número de linfocitos T CD3+CD4+. Sin embargo, el número de linfocitos CD3+CD8+ se mantiene en pacientes con PAL y disminuye en pacientes con PAG. En estudios previos en modelos

experimentales y pacientes con PA, en los que no se realiza el estudio cinético por nosotros efectuado, se describen resultados heterogéneos sobre la distribución de ambas subpoblaciones de linfocitos T, que coinciden con el patrón evolutivo demostrado por nuestro trabajo (468, 465, 469). Nuestros datos demuestran que la situación de este compartimiento es variable en el tiempo y se relaciona con la gravedad del proceso. Se ha considerado que los hallazgos cuantitativos encontrados en la subpoblación de linfocitos T CD3+CD8+ se relacionan con la intensidad y la extensión de la necrosis y el desarrollo de complicaciones infecciosas en pacientes graves (464). Por otro lado, en un modelo murino deplecionado de linfocitos CD8+ no hay cambios en la gravedad pero sí hay reducción de la misma cuando se retiran los linfocitos CD4+ (467).

También analizamos la expresión de las isoformas CD45RA y CD45RO en los linfocitos T de estos pacientes. Es conocido que la intensidad de expresión de ambas isoformas se relaciona con el estado de activación de linfocitos T y con la exposición antigénica, siendo predominante la isoforma CD45RA en poblaciones naïve y la isoforma CD45RO en poblaciones memoria/efectoras. Se observa claramente, desde el inicio del brote hasta las 48 horas de evolución, un predominio de la expresión de la isoforma CD45RO en linfocitos CD4+ y CD8+, y concomitantemente se detecta una predecible disminución de la isoforma CD45RA en ambas subpoblaciones. Estos hallazgos demuestran sin lugar a dudas un estado de activación intenso y amplio del compartimiento linfocitario T en pacientes con PA, sin que se constaten diferencias entre los dos grupos de pacientes estudiados, salvo de forma puntual a las 48 horas de evolución en la subpoblación de linfocitos T CD4+.

El proceso de activación de linfocitos T es complejo y en su regulación participan diferentes señales de carácter antigénico mediadas por citoquinas junto con otros estímulos. En la activación inducida a través del TCR-CD3, la señalización en la célula diana se modula por la estimulación de las moléculas CD28 (efecto anti-apoptótico) y CD152 (efecto supresor proapoptótico) (ver sección 2.3.3). Así mismo, el nivel de expresión o la ausencia de CD28 en la membrana citoplásmica de linfocitos T se ha relacionado con estados de activación celular. Los linfocitos T CD28- se asocian a estados de activación inadecuada y se ha sugerido una posible acción supresora (340, 342). Nuestros resultados demuestran claramente que se producen anomalías en la expresión del CD28 en la subpoblación de linfocitos T CD4+ y CD8+ durante las fases iniciales de la PA. Desde un criterio porcentual destaca el incremento de linfocitos T CD4+CD28- en los pacientes con PAL y una progresiva disminución en los

pacientes con PAG, mientras que en los linfocitos T CD8+CD28- se objetiva un incremento persistente en los pacientes con PAG. En términos absolutos, sin embargo, se observa una disminución preferencial de linfocitos CD4+CD28- en los pacientes con PAG y no en aquellos que sufrieron la forma leve de la enfermedad, mientras que el número de linfocitos T CD8+CD28- desciende en estos últimos y se mantiene en pacientes graves. Al observar la expresión de CD152 en linfocitos T se objetiva un incremento de los niveles de expresión en linfocitos T CD4+ y CD8+ en ambos grupos de pacientes, mientras que en valores absolutos se observa una tendencia al aumento de linfocitos T CD4+CD152+ y cambios de menor relevancia biológica en linfocitos T CD8+CD152+. Tomando en conjunto estos datos indican un estado de anómala activación del compartimiento T con niveles de intensidad variable en cada una de las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y CD8+, y en función de la gravedad de la enfermedad.

Esta misma conclusión se puede deducir del análisis de la expresión del ligando CD40 (CD154), aunque su relación con la gravedad de la enfermedad es menos notorio. En este sentido debe señalarse que en modelos experimentales murinos la vía de estimulación CD40-CD40L no modificó el desarrollo de la PA aunque sí la posterior asociación a patología extrapancreática (560). No obstante, este hecho no tiene comparación en nuestro estudio, ya que no se analizaron fases evolutivas tardías de la PA.

Además del análisis de moléculas implicadas en la activación linfocitaria a través de la vía de señalización del TCR-CD3, estudiamos la expresión de otros antígenos linfocitarios asociados a la activación temprana de linfocitos T. Nuestros hallazgos no demuestran una dramática modificación en la expresión de los antígenos de activación CD122, CD71 y CD69 en pacientes con PA. Sin embargo, sí se aprecia una precoz y mantenida expresión de CD25 en linfocitos T CD4+. Llama la atención que en este caso incluso llega a observarse un incremento en cifras absolutas de linfocitos CD4+CD25+ en los pacientes con PAL. Resultados similares se encontraron al analizar la expresión de estos antígenos de activación en la subpoblación linfocitaria T CD8+. Debe señalarse que la subpoblación linfocitaria T CD4+CD25+ se ha asociado a actividad supresora (342), y que la linfopenia globalmente observada en la población linfocitaria T de estos pacientes no incluye a dicha subpoblación. La función reguladora de estas células, por lo tanto, podría relacionarse con una actividad potencial moduladora del estado de inflamación de los pacientes con PA. De la observación de nuestros datos vuelve a deducirse una variación temporal del estado de activación del

compartimiento linfocitario T a lo largo de los 5 días de evolución, con un comportamiento diferencial a las 48 horas, y sin diferencias destacables entre pacientes con PAL y PAG.

Otro marcador de activación de linfocitos T, implicado en la capacidad de presentación antigénica durante la respuesta inmune, es la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, MHC II (HLA-DR). Al analizar su expresión en linfocitos T de pacientes con PA se observa un incremento porcentual relevante, independientemente de la gravedad del episodio inflamatorio, y de nuevo, se aprecia una conservación de sus cifras absolutas. Por otro lado, la expresión de CD38, un marcador de activación temprano con implicaciones en la regulación del tráfico linfocitario, muestra una clara disminución en ambos grupos de pacientes. Debe señalarse que esta molécula, que se expresa preferencialmente en linfocitos naïve, se encuentra porcentualmente disminuida y dramáticamente reducida en términos absolutos tanto en pacientes con PAL como con PAG. Por lo tanto, este hecho puede relacionarse con el observado descenso de los linfocitos T CD3+CD45RA+, o bien indicar una modificación en el patrón de recirculación, con indicación de una disminución de la accesibilidad a los territorios linfoides por la precocidad de los hallazgos.

El conocimiento previo sobre la activación de linfocitos T durante la PA es bastante escaso, algunos autores observan un aumento de linfocitos CD25+ y CD69+ y una disminución de linfocitos HLA-DR+ que coincide con nuestros resultados (471), sin embargo obtenemos datos contrarios respecto a la expresión de CD69 en linfocitos CD4+ y CD8+ comparados con otros estudios (472, 465). Esto puede deberse a diferencias en las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio y a los tiempos de evolución seleccionados.

Otras poblaciones linfocitarias estudiadas incluyen los linfocitos B (CD19+) y las células NK (CD3-CD56+). En el caso de los linfocitos B se observa una marcada linfopenia que tiende a recuperarse a los 5 días de evolución y que desde una perspectiva porcentual alcanza un descenso significativo a las 48 horas de evolución del brote. Al analizar la expresión de MHC II (HLA-DR) en esta población, no se aprecian modificaciones relevantes porcentuales pero, como era previsible, sí una reducción importante en cifras absolutas. En relación a la expresión de CD38 por linfocitos B CD19+ se aprecian variaciones significativas, preferentemente en pacientes con PAG. Por el contrario, y de forma diferencial con los linfocitos T y B, no se observa linfopenia de células NK, sino que se constata un incremento relativo que tiende a la normalización a los 5 días de evolución.

Tras la integración global de estos resultados, es claro que la PA se acompaña de una profunda alteración del compartimiento linfocitario T y B en cifras absolutas en sangre periférica. En linfocitos T, se aprecia una relevante redistribución de sus subpoblaciones definida por la expresión de las isoformas del CD45 que se puede interpretar como una inadecuada e intensa activación. Hecho que no se acompaña del aumento generalizado de expresión de otros antígenos de activación. Este estado funcional no se observa de forma tan acusada en el compartimiento B. Así mismo, se constata una menor variación y la ausencia de compromiso cuantitativo de las células NK. Estas modificaciones tienen carácter dinámico con tendencia de alguno de los parámetros a normalizarse a lo largo de los 5 días de evolución, y con diferencias en el grado de afectación en alguna de las mencionadas poblaciones linfocitarias en función de la gravedad de la enfermedad.

La causa de estas alteraciones linfocitarias no se conoce pero, obviamente, debe estar relacionada con el daño pancreático y por lo tanto pone de manifiesto el carácter sistémico de la enfermedad. En su patogenia pueden influir, al menos en las fases iniciales, no sólo la exposición a los productos pancreáticos liberados por la inflamación de la glándula, sino a la respuesta frente al stress. En este sentido el patrón de alteración cuantitativa observado inicialmente podría remedar a las alteraciones encontradas en individuos sanos sometidos al stress del ejercicio intenso (561-563). Por lo tanto, podrían implicarse variables neuroendocrinas propias de la respuesta al stress (564, 565). Sin embargo, el patrón temporal evolutivo indica que la acción de los productos liberados en la inflamación pancreática debe tener un papel patogénico relevante. En definitiva, se objetiva una linfopenia de linfocitos T y B con una clara activación del compartimiento celular T. La posible participación de microorganismos o de sus productos en la patogenia de estas alteraciones no es descartable aún en ausencia clínica de infección. Aunque nuestro análisis en fases precoces no pone de manifiesto la presencia de infección bacteriana, la incidencia de complicaciones infecciosas en estos pacientes está bien caracterizada y no se pueden excluir fenómenos de translocación bacteriana. Podemos afirmar, pues, la existencia de un anómalo estado de activación del sistema inmune, y la participación activa de leucocitos y sus productos en la regulación y fase efectora de la respuesta inflamatoria con potenciales implicaciones en el órgano desencadenante, así como posibles daños tisulares extrapancreáticos.

3. Análisis de la expresión de moléculas relacionadas con el tráfico linfocitario en linfocitos de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda

El análisis de las implicaciones patogénicas del sistema inmune-inflamatorio en diversas patologías plantea diferentes cuestiones relacionadas con la emigración de las células reguladoras y efectoras a los tejidos y sus interacciones con el endotelio vascular. El estudio de la realidad de los pacientes conlleva limitaciones experimentales por motivos éticos obvios. En este sentido no es posible conocer con exactitud experimental el tráfico y la emigración de células concretas ni de subpoblaciones a los tejidos *in vivo*, ni de su interacción con el endotelio vascular y tejidos linfoides. Por lo tanto, la aproximación del estudio debe fundamentarse en el análisis de variables biológicas que puedan ser cuantificables e indicar la posible existencia de alteraciones en los patrones de tráfico y distribución tisular de leucocitos. Sobre la base de estas premisas decidimos investigar la expresión de moléculas de superficie leucocitarias implicadas en la regulación de estos procesos, en concreto moléculas de adhesión y quimiorreceptores (QRs).

Comenzamos nuestro estudio analizando la expresión de las integrinas CD11a y CD11b en linfocitos T y B de pacientes con PA. La expresión elevada de CD11a (CD11a^{high}) se asocia a estadios efectores de linfocitos T y la capacidad de migración tisular, mientras que niveles bajos de expresión (CD11a^{low}) se relacionan con células naïve y a recirculación linfática (221-223). En nuestros datos se observa claramente que las fases precoces de la PA se asocian a un incremento de expresión de CD11a^{high} y reducción de CD11a^{low} en linfocitos T CD3+ de los pacientes con tendencia a la conservación cuantitativa de ambos parámetros. En los linfocitos B CD19+, la expresión de CD11a no se modifica de forma relevante porcentual con disminución de cifras absolutas. En relación con la expresión de CD11b, también se observa un incremento de la expresión en linfocitos T CD3+ que se mantiene durante el periodo evolutivo estudiado, mientras que en linfocitos de estirpe B se produce una disminución de este antígeno. La extravasación a tejido mediada por CD11b es un tema candente en la PA por su asociación con el daño histológico del páncreas y el desarrollo de complicaciones como el ARDS. El daño pulmonar en pacientes con PAG se ha relacionado con la extravasación de neutrófilos activados que expresan CD11b (484). Actualmente se estudian diversas inmunoterapias basadas en el bloqueo de los ligandos de CD11b en el endotelio, ICAM-1 y V-CAM1, con resultados alentadores aunque su eficacia está por demostrar (486, 487).

El estudio de la expresión de QRs, una familia muy versátil desde el punto de vista funcional, en linfocitos, no sólo responde a la necesidad de conocer sus rutas de recirculación y destino final, sino que nos va a proporcionar información sobre el grado de activación, posible función y tipo de respuesta inmune (polarización Th1/Th2) de la población efectora extravasada. Estudiamos 5 QRs relacionados con la recirculación linfocitaria y la activación celular (CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR4) (ver sección 2.3.2.). Nuestros datos demuestran que, a nivel de la población linfocitaria, se produce una importante y generalizada modificación en la expresión de los QRs analizados en linfocitos T CD3+, B CD19+ y células NK CD3-CD56+, observándose diferentes patrones de expresión en pacientes con PAL y PAG. En este sentido cabe destacar la sobreexpresión de CCR2, un QR asociado a estados inflamatorios, en las diferentes poblaciones linfocitarias con predominio en pacientes con PAG, y el mantenimiento e incluso aumento de cifras absolutas de estas células pese a la linfopenia T y B. Este hallazgo apunta a establecer que en la etiopatogenia de las alteraciones linfocitarias de pacientes con PA tiene un papel extremadamente relevante el estímulo inflamatorio propio de esta enfermedad, ya sea mediado por factores químicos o por la posible presencia de estímulos microbianos. Así mismo, destaca la precocidad de los hallazgos. Por otro lado, la expresión de CCR5 está claramente aumentada tanto en valores relativos como absolutos en linfocitos T CD3+ de ambos grupos de pacientes con PA, indicando una activación preferencial de tipo Th1. En linfocitos B CD19+ y células NK CD3-CD56+, los cambios de expresión de esta molécula no se pueden considerar biológicamente dramáticos aunque destaca su aumento de expresión en células NK a 5º día de evolución del brote en pacientes con PAG. En relación con la expresión de CCR6, un QR expresado por linfocitos activados que migran principalmente a mucosa, destaca su incremento progresivo de forma preferencial en linfocitos T CD3+. La expresión de CXCR3, un QR asociado a respuesta Th1 e inflamación, sigue un patrón similar a otro QR análogo, el CCR2, aunque los valores son mayores en pacientes con PAL. Debe señalarse que la expresión de CXCR4, que identifica patrones de migración a tejido linfoide, se encuentra también aumentada en linfocitos T CD3+ y B CD19+, y células NK CD3-CD56+, tanto en valores porcentuales como en cifras absolutas. No se aprecian por lo tanto patrones marcadamente diferentes entre pacientes con PAG y PAL en la expresión de estos QRs por las poblaciones indicadas.

La expresión de QRs en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T no sólo afecta a su redistribución entre los diferentes compartimientos del sistema inmune y/o a su extravasación preferencial a tejidos y órganos específicos, sino que contribuye a la activación

y capacidad efectora del linfocito. Dentro del grupo de patologías inflamatorias, el estudio de las alteraciones en la expresión de estas moléculas constituye la base de importantes hallazgos relacionados con la implicación etiopatogénica de las poblaciones extravasadas. En este sentido los QRs CCR5 y CXCR3 se han asociado a enfermedades inflamatorias con un patrón Th1, mientras que CCR3 y CCR4 se encuentran implicados en procesos de patrón Th2 (237, 239, 265, 281, 282). Otros QRs como CCR6 parecen tener relevancia patogénica en enfermedades inflamatorias con afectación de piel y mucosas (286, 292, 294), mientras que CCR2 se asocia a procesos inflamatorios sin especial asociación al tipo de respuesta o localización anatómica (264, 265), y CXCR4 controla la recirculación a órganos linfoides secundarios (302). Teniendo en cuenta estas premisas y la disponibilidad de reactivos, estudiamos la expresión de CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3, y CXCR4 en diferentes subpoblaciones de linfocitos T cuyo análisis previo dentro de este estudio ha demostrado una posible relación con el estado de activación anómalo de estos pacientes.

Nuestros resultados muestran un aumento generalizado de la expresión de QRs y una conservación o ligero aumento de las cifras absolutas, con excepción del número de linfocitos CCR6+, en las principales subpoblaciones de linfocitos T (CD3+CD4+, CD3+CD8+). Los valores relativos son generalmente superiores en pacientes graves respecto a leves, principalmente en la expresión de CCR2 y CXCR4, mientras que el número de linfocitos que expresan los QRs es inferior a las 48 horas de evolución en aquellos pacientes que desarrollan la forma grave de la enfermedad. Estas diferencias en el número de células tienen como probable desencadenante la mayor linfopenia observada en pacientes con PAG y suponen, junto con el aumento de expresión de QRs, otro punto de apoyo a la hipótesis de una mayor extravasación a la glándula relacionada con la gravedad. Respecto a las diferentes subpoblaciones de linfocitos T activados definidas por la expresión de las isoformas del CD45, linfocitos naïve (CD3+CD45RA+) y memoria/efectores (CD3+CD45RO+), la expresión de los marcadores de activación CD25, CD56 y CD11b (CD4+CD25+, CD8+CD25+, CD3+CD56+, CD3+CD11b+), así como, de la expresión de la molécula coestimuladora CD28 (CD4+CD28+, CD8+CD28+, CD4+CD28-, CD8+CD28-), observamos un aumento de la expresión de CCR2, CCR5, CXCR3 y CXCR4, y una disminución de CCR6, en las fases iniciales del brote. Los pacientes diagnosticados de PAG muestran un aumento de CCR2 y CXCR4 en las subpoblaciones efectoras activadas respecto a aquellos que fueron diagnosticados como PAL, mientras que estos últimos expresan con mayor intensidad CCR5 y CXCR3 en dichas subpoblaciones. Como

norma general observamos una ausencia de normalización de los valores al 5° día de evolución del brote. A este comportamiento generalizado se encuentran notorias excepciones en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ con capacidad reguladora /inmunosupresora (CD4+CD28- y CD8+CD28-) en las que se observa una tendencia a la disminución de la expresión de QRs. Debido a la linfopenia asociada estos pacientes, el estudio de cifras absolutas revela una predominancia del descenso del número de linfocitos, sin embargo, observamos incrementos puntuales en la expresión de alguno de los quimiorreceptores en diferentes subpoblaciones de linfocitos T activados, asociados a la forma evolutiva leve y/o grave de la enfermedad.

Es interesante destacar que, desde un aspecto patocrónico, en el momento inicial del diagnóstico de los pacientes clasificados como PAL y PAG, el patrón de expresión de quimiorreceptores en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T es similar en ambos grupos de enfermos. Sin embargo, en las 48 horas de evolución del brote se observa una segregación en estas variables biológicas en función de la gravedad de la enfermedad, con una tendencia a la normalización, en líneas generales, en los pacientes con PAL.

La interpretación de estos hallazgos es difícil y no hemos encontrado estudios previos en modelos experimentales que, permitan establecer los patrones de recirculación y distribución tisular de la población linfocitaria T durante la PA y su posible asociación con lesiones inflamatorias de la glándula pancreática, así como de la mayor o menor intensidad del compromiso sistémico. Por lo tanto, la diferencia del comportamiento evolutivo entre ambas formas de la enfermedad podría relacionarse, de forma no mutuamente excluyente, con una diferente distribución tisular de distintas subpoblaciones linfocitarias T a nivel extravascular, y/o con una mayor o menor intensidad de los estímulos causantes del compromiso del compartimiento linfocitario T. Teniendo en cuenta la fisiopatología de la expresión de QRs, estas señales podrían proceder del estímulo enzimático, de la producción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios por el tejido inflamado pancreático y extrapancreático, incluyendo el endotelio, y/o de componentes bacterianos. Es posible que existan diferencias en estos componentes, entre pacientes con PAL y PAG, que pudieran explicar las variaciones en el patrón evolutivo de la expresión de QRs en linfocitos T. Debe señalarse que el aumento de la expresión de QRs en linfocitos CD3+CD4+, y de CCR2 y CXCR4 en linfocitos CD3+CD8+ en pacientes con PAG respecto a PAL, refuerza este

concepto patogénico de mayor exposición a estímulos inductores de su expresión (237, 239, 265, 281, 282).

Es interesante discutir el comportamiento diferencial de las consideradas subpoblaciones inmunoreguladoras de linfocitos T (CD4+CD25+, CD4+CD28- y CD8+CD28-), en la expresión de QRs, en relación a otras subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+. De forma general se observa una menor expresión relativa de QRs por estas subpoblaciones, mientras que su presencia, también relativa, en sangre periférica se encuentra aumentada. Obviamente, la adecuada interpretación de estos resultados requeriría un exhaustivo conocimiento de los factores etiopatogénicos responsables de la estimulación de linfocitos T, así como de la distribución tisular a nivel vascular y extravascular. Sin embargo, se puede establecer que el entorno sanguíneo y tisular del paciente con PA, provoca un efecto diferencial en estas subpoblaciones inmunoreguladoras de carácter globalmente supresor, respecto a aquellas otras con capacidad inductora y/o efectora en la respuesta inmune inflamatoria. De forma complementaria, la pérdida de expresión de QRs podría reflejar un menor grado de extravasación de estas subpoblaciones a los tejidos, así como una activación relativamente menos intensa, respecto al resto de poblaciones linfocitarias T implicadas en la generación del proceso inflamatorio (258, 270, 274, 299, 240). En este sentido, la disminución de la expresión de QRs en linfocitos CD4+CD28- en pacientes con PAL respecto a PAG podría asociarse a una respuesta inflamatoria de menor intensidad en estos pacientes.

Por otro lado, en linfocitos B activados (CD19+CD11b+) se observa también un incremento de CCR2, CXCR3 y CXCR4 en ambos grupos de pacientes, mientras que la expresión de CCR5 aumenta en pacientes con PAL y disminuye en pacientes con PAG, y la expresión de CCR6 se mantiene dentro de los valores control. Este patrón tiende a intensificarse a las 48 horas en pacientes leves, disminuyendo pero sin llegar a normalizarse al 5º día, mientras que en pacientes graves los niveles se mantienen o muestran un progresivo descenso más acusado al 5º día de evolución. Este comportamiento refuerza el concepto de la relevancia del entorno inflamatorio provocado por la PA en el SI del paciente con tendencia a la inducción de un proceso de activación inadecuado de sus elementos celulares.

4. Análisis de la producción intracelular de citoquinas en linfocitos T naïve y memoria/efectores de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda

El análisis de las implicaciones patogénicas del compartimiento T en enfermedades inflamatorias, ocupa un papel relevante en la cuantificación de la capacidad de síntesis de citoquinas. Estas moléculas, en relación a su producción por linfocitos T, tienden a asociarse con diferentes patrones de producción que, en sus formas extremas, conllevan diferentes comportamientos de la respuesta inmune inflamatoria. Así, la producción de IFN γ se asocia a una respuesta tipo Th1 (400, 401, 440) y la producción de IL4 a una respuesta tipo Th2 (400, 425), por otro lado la producción de IL6, TNF α e IL10 se identifica con estados inflamatorios en virtud de su capacidad pro-inflamatoria (IL6 y TNF α) o anti-inflamatoria (IL10) (406, 434, 437, 453). Desde una perspectiva general, nuestros datos indican que en la PA no se observa una polarización definida del compartimiento linfocitario T hacia una respuesta tipo Th1 o Th2, ya que se produce un aumento tanto de IFN γ como de IL4.

El análisis de los linfocitos T naïve (CD3+CD45RA+) pone en evidencia un aumento generalizado de la producción intracelular de todas las citoquinas estudiadas tanto en pacientes con PAL como en PAG. No se aprecian diferencias marcadas entre los dos grupos de pacientes estudiados salvo en relación a la IL10, que se encuentra aumentada en pacientes leves pero permanece dentro de los valores control en pacientes graves. La evolución temporal de los niveles de producción de citoquinas no es uniforme aunque se observa una tendencia hacia la disminución a las 48 horas que se mantiene o reagudiza a los 5 días, con patrones diferentes entre ambas formas evolutivas de la enfermedad. En este sentido destaca la recuperación los niveles de IFN γ , TNF α e IL4, por encima de los valores control, al 5° día de evolución del brote en pacientes con PAL, mientras que en pacientes con PAG se produce una disminución progresiva de IFN γ y TNF α , y una recuperación menos notoria de IL4. Este comportamiento podría sugerir un mantenimiento de la extravasación de linfocitos T naïve productores de citoquinas en pacientes diagnosticados de la forma leve de PA, respecto de aquellos que padecen la forma grave.

En relación con los linfocitos T memoria/efectores (CD3+CD45RO+) se observa que, en el momento del diagnóstico, ambos grupos de pacientes estudiados tienen aumentada la producción intracelular de IL4, IL6 e IL2 sin que el resto de citoquinas analizadas muestre cambios significativos. Durante la evolución del brote inflamatorio los niveles de producción de citoquinas por esta subpoblación linfocitaria tienden a disminuir en las primeras 48 horas,

independientemente de la gravedad de la enfermedad, recuperándose los niveles basales al 5° día en pacientes con PAL con excepción de los niveles de IFN γ y TNF α . Sin embargo, el estudio independiente de las dos principales subpoblaciones linfocitarias T memoria/efectoras, CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+, revela un marcado patrón Th2 en ambas subpoblaciones en pacientes con PAL respecto a PAG, mientras que en estos últimos se produce un significativo aumento de la producción de TNF α por linfocitos T CD4+CD45RO+ y de IFN γ en linfocitos T CD8+CD45RO+ respecto a pacientes leves indicando un patrón Th1. Es interesante destacar la marcada disminución de la producción de IL10 tanto por linfocitos T CD4+CD45RO+ como CD8+CD45RO+ en ambos grupos de pacientes respecto a controles sanos, lo cual sugiere una limitación en la capacidad inmunoreguladora del proceso inflamatorio por estas células.

La interpretación de estos hallazgos está limitada por las observaciones disponibles y pudiera relacionarse con un proceso de extravasación selectivo de células memoria/efectoras con patrón proinflamatorio o a una refractariedad relativa del patrón Th1 de activación con respecto a los linfocitos Th2. Por lo tanto, el patrón considerado paradigmático del comportamiento de las citoquinas séricas en pacientes con PA, que revela un aumento tanto de citoquinas pro-inflamatorias como antiinflamatorias de demostrado valor predictivo de gravedad (42, 522, 524, 525, 533, 534), no puede imputarse de forma específica a lo observado en el compartimiento linfocitario T en sangre periférica de estos pacientes. Otras poblaciones celulares pertenecientes o no al sistema inmune tienen que implicarse de forma trascendente en la producción de estas moléculas sin descartar la relevancia de los linfocitos T titulares, y su relación con la gravedad de la patología.

5. Análisis de la muerte celular por apoptosis en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda

Un hallazgo histológico observado de forma fehaciente en la PA es la linfopenia, desde el punto de vista etiopatogénico esta reducción celular puede explicarse por la muerte de esta población o por su extravasación. Nosotros abordamos esta evidencia mediante el análisis de la expresión de quimiorreceptores implicados en la distribución tisular, cuyas alteraciones ya han sido discutidas previamente en esta patología, y la cuantificación de la apoptosis *ex vivo* y tras cultivo *in vitro*.

Nuestros resultados muestran un aumento y una disminución progresiva de la apoptosis espontánea respectivamente en linfocitos T naïve CD3+CD45RA+ y

memoria/efectores CD3+CD45RO+ en pacientes con PA durante el brote inflamatorio sin diferencias relevantes entre pacientes leves y graves. Tras el cultivo *in vitro*, se observa una disminución de la apoptosis de ambas subpoblaciones, analizadas en ausencia de estímulo, independientemente de la gravedad del episodio inflamatorio, mientras que, en presencia de PHA, se produce un aumento que en líneas generales tiende a disminuir a los 5 días de evolución. Estos resultados pueden explicarse por una posible apoptosis espontánea elevada que hace que tras 24h de cultivo no se ponga de manifiesto por haberla sufrido ya las poblaciones susceptibles *in vivo*. Sin embargo, tras la estimulación que provoca una demanda adicional de los linfocitos T se revela ese estado de anómala activación que conlleva una susceptibilidad a la apoptosis.

Estos hallazgos son diferentes a los observados en procesos inflamatorios de patogenia inmunológica como algunas enfermedades autoinmunes entre las que se encuentra la esclerosis múltiple (566). Lo cual sugiere que, en este proceso de sensibilización a la entrada en apoptosis, puedan utilizarse vías diferentes de inducción como la vía del Fas/FasL (CD95/CD95L). En este sentido debe señalarse que los linfocitos T CD4+ y CD8+ tienen una marcada reducción de CD95 en valores relativos y absolutos en pacientes con PAL respecto a controles sanos, mientras que en pacientes con PAG los valores absolutos se mantienen por debajo en ambas subpoblaciones; no obstante, en este grupo de pacientes la disminución en valores relativos afecta únicamente a los linfocitos CD8+. Aunque obviamente no puede descartarse que la reducción en cifras absolutas se deba a la muerte previa de estas subpoblaciones, llama la atención que los valores sean significativamente superiores en pacientes graves respecto a leves. Se ha sugerido que la reducción por apoptosis de los linfocitos T en pacientes con PAL, al ser mayor que en PAG, pudiese constituir un mecanismo de limitación de daño pancreático al evitar la presencia de linfocitos T efectores de implicación patogénica (543). Nuestros resultados no permiten apoyar o refutar esta interpretación, aunque la tendencia a la normalización en ambos grupos a los 5 días de evolución del brote cuestiona su validez.

6. Análisis fenotípico y funcional de monocitos en sangre periférica de pacientes con Pancreatitis aguda

El estudio exhaustivo de la población linfocitaria ha revelado numerosas alteraciones en la activación, recirculación, extravasación y función efectora en linfocitos T y B de pacientes con PA durante las primeras fases del brote, con claras diferencias en función de la

gravedad. Dentro de una caracterización del sistema inmune de los pacientes con PA investigamos, de forma complementaria a los estudios efectuados en el compartimiento linfocitario T y B, la población monocitaria en sangre periférica. Está establecida la relevancia de esta población celular en el desencadenamiento, regulación y fase efectora de la respuesta inmune inflamatoria. Por lo tanto, consideramos su estudio fenotípico y funcional para poder comprender la relevancia de las alteraciones del sistema inmune/inflamatorio en la enfermedad objeto de estudio.

En los pacientes con PAL observamos un estado de activación incrementado desde las fases iniciales de la enfermedad, con aumento de la expresión de HLA-DR (MHC II), CD80, CD62L y CD40. A lo largo de los cinco días de estudio se observa un comportamiento heterogéneo de la expresión de estas moléculas, que tiende a normalizarse en el caso de la expresión de CD62L y HLA-DR, mientras que los niveles de expresión de CD80 y CD40 permanecen elevados. El comportamiento de estos parámetros en la población monocitaria de pacientes con PAG es claramente diferente, observándose una disminución inicial de CD80, HLA-DR y CD40, que se incrementa progresivamente con la evolución del brote. La excepción a este comportamiento es la expresión de CD62L que, al igual que en los pacientes leves, se encuentra elevada en las fases iniciales y tiende a disminuir con el proceso inflamatorio. Obviamente, debido a la monocitosis existente en estos pacientes, en cifras absolutas se cuantifica un aumento del número de monocitos que expresan estas moléculas, con excepción del número de monocitos CD14+HLA-DR+ en pacientes con PAG. Es interesante destacar que los valores son superiores en pacientes leves respecto a graves, con excepción del número de monocitos CD14+CD62L+.

Estos datos ponen de manifiesto que el patrón de compromiso de la población monocitaria es diferente en ambos grupos de pacientes, lo cual sugiere que la intensidad del daño necrótico inflamatorio con las correspondientes implicaciones en el sistema inmune es variable. No es posible establecer el mecanismo responsable de este comportamiento diferencial, pero se puede sugerir que el impacto de la señalización asociada a la glándula pancreática pudiera llegar a tener efectos, al menos iniciales, de carácter tóxico cuando se alcanzan unos niveles muy elevados como son los de la forma grave de la enfermedad. Desde una perspectiva funcional, la disminución de CD80 y HLA-DR en los monocitos de aquellos pacientes que desarrollan la forma grave de la enfermedad, podría conllevar una inadecuada cooperación con los linfocitos T reguladores con la consiguiente generación de respuestas

antiinfecciosas inadecuadas. Debe citarse que de estas moléculas la expresión de HLA-DR ha sido ya estudiada por otros autores y en coincidencia con nuestros resultados se ha relacionado con la intensidad de la gravedad en pacientes con PA, constituyendo un marcador predictivo (477, 478, 475, 42). El aumento de la expresión de CD62L, concordante en ambos grupos de pacientes, se relaciona con una mayor recirculación de estas células hacia el ganglio linfático con el previsible efecto amplificador de los mecanismos de inflamación.

El compromiso de la población monocitaria en la PA también se pone de manifiesto en el análisis de la expresión de moléculas directamente relacionadas con la redistribución tisular como son los quimiorreceptores. Se observa un generalizado incremento de su presencia en la membrana citoplásmica de estas células con excepción de la expresión de CCR5. Esta sobreexpresión es compartida por ambos grupos de enfermos, por lo que no es imputable este mecanismo a la intensidad de las manifestaciones clínicas del proceso inflamatorio, aunque pueden participar patogénicamente en el desarrollo de complicaciones locales y/o sistémicas. Debido a su relevancia en la regulación de la infiltración tisular puede especularse que dichas moléculas lleguen a constituir nuevas dianas terapéuticas, este hecho básico es compartido por otras enfermedades y ya ha habido ensayos terapéuticos iniciales en este sentido.

Desde un punto de vista funcional planteamos el análisis de la cuantificación de citoquinas intracelulares implicadas en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria en su fase efectora. De nuevo se pone de manifiesto el impacto del proceso inflamatorio pancreático y de sus consecuencias moleculares, incluyendo las enzimáticas, en la población linfocitaria. Existe una disminución del porcentaje de monocitos que producen IL6, IL1 β y TNF α , aunque debido a su expansión y a los hallazgos publicados previamente de los niveles séricos de estas citoquinas, el efecto neto sea el de un incremento habida cuenta de la acusada monocitosis. A lo largo de la evolución los pacientes con PAL incrementan la expresión de estas citoquinas normalizando los valores de IL6, mientras que los pacientes con PAG experimentan una progresiva disminución. Esto podría explicarse por una menor intensidad y duración del estímulo lesivo en los pacientes con formas menos graves de la enfermedad. Por otro lado, la capacidad fagocítica y de generación de radicales libres de NO, otro parámetro de actividad biológica de las células monocitarias, está drásticamente afectada en pacientes con PA desde el inicio del brote de inflamación pancreática e independientemente de la gravedad de la enfermedad. En consonancia con otros hallazgos de nuestro estudio, en pacientes con

PAL se observa una progresiva recuperación de la función efectora, mientras que en los pacientes con PAG no se producen cambios o empeoran.

Las implicaciones patogénicas de estos hallazgos se pueden asociar a una mayor predisposición a procesos infecciosos. En relación con el NO existen controversias sobre el potencial efecto lesivo de esta molécula en la PA (550, 551, 555, 556), nuestros datos indican su disminución, al menos en la síntesis por estas células, asociada a la intensidad de la enfermedad. Sin embargo, hay estudios que demuestran que el bloqueo de la iNOS puede tener efectos protectores (553, 554) lo que indicaría que la relevancia patogénica del NO corresponde a otras estirpes celulares.

Tomados en conjunto los datos de nuestro trabajo, se pone de manifiesto la existencia de una intensa y amplia alteración del sistema inmune en pacientes con PA desde las fases iniciales de la enfermedad. Esta anomalía se extiende a los principales compartimientos celulares incluyendo linfocitos T y B y monocitos. Desde una perspectiva etiopatogénica, la precocidad de estas alteraciones se relaciona con la propia generación de moléculas con actividad inflamatoria y/o tóxica, producida en el órgano lesionado, más que con potenciales estímulos biológicos y complicaciones infecciosas que no son características de esta fase inicial del proceso. Sin embargo, no puede descartarse la posible implicación del aumento de la translocación bacteriana ni del stress neuroendocrino asociado a la PA. Por otra parte, existen claras diferencias en el comportamiento del sistema inmune en los pacientes con PA en relación con la gravedad de la patología. Sean cuales sean los mecanismos directamente implicados en la inducción de esta alteración del sistema inmune, queda claramente establecida su existencia y, debido al estado anómalo de activación y de expresión de moléculas implicadas en la regulación de la distribución tisular observado en las diferentes subpoblaciones linfocitarias y monocitarias, puede sugerirse razonablemente su implicación en el desarrollo y/o amplificación de las lesiones titulares locales y sistémicas características de esta enfermedad. Así pues, el control de esta alteración inmunológica puede constituir una diana terapéutica.

CONCLUSIONES

De nuestro estudio del análisis de las poblaciones circulantes del sistema inmune de pacientes con PA leve y grave se concluye que:

- 1) Existe una profunda alteración en el compartimiento linfocitario T, que se encuentra disminuido en cifras absolutas, caracteriza por:
 - a) redistribución de sus subpoblaciones, con predominio de las efectoras activadas, más intensamente en las formas leves de la enfermedad, y modificación de la expresión de moléculas coestimuladoras e inmunoreguladoras.
 - b) alteraciones de las moléculas implicadas en la distribución tisular, con aumento de la expresión de las de adhesión y los quimiorreceptores, siendo predominantes los quimiorreceptores relacionados con la inflamación en los pacientes con pancreatitis aguda grave, y los asociados a la activación celular en los pacientes con pancreatitis aguda leve.
 - c) alteración en la capacidad productora de citoquinas con predominio de ambos patrones de secreción Th1 y Th2 en la población naïve, y del patrón Th2 y proinflamatorio en la población efectora, con disminución asociada de la capacidad antiinflamatoria.
 - d) incremento de la apoptosis espontánea e inducida, especialmente en la población efectora, y aumento de CD95 en pacientes con formas graves de la enfermedad con respecto a las leves.
- 2) Existe compromiso del compartimiento B, que se encuentra disminuido, sin incremento de la expresión de marcadores de activación pero con aumento de quimiorreceptores.
- 3) Existe linfocitosis de células NK con aumento de la expresión de quimiorreceptores.
- 4) El compartimiento monocitario está alterado con marcada monocitosis con predominio en los pacientes con pancreatitis aguda grave:
 - a) los pacientes con pancreatitis aguda leve muestran un aumento de la expresión de marcadores de activación que, en las formas graves, se

expresan con menor intensidad o incluso se encuentran drásticamente disminuidos.

- b) la capacidad de producción de citoquinas intracelulares, así como de las funciones efectoras relacionadas con la actividad fagocítica y microbicida, se encuentra disminuida, con valores notoriamente inferiores en pacientes con pancreatitis aguda grave.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Introducción: Aspectos Clínicos

- 1.- Karimgani I., Porter K., Langevin R., et al. *Pronostic factors in sterile pancreatic necrosis* **Gastroenterology** 1992; 103: 1636-40
- 2.- Banerjee A., Kaul A., Bache E., et al. *An audit. Of fatal acute pancreatitis* **Postgrade Medicine Journal** 1995; 71: 472-5
- 3.- Bradley E., Allen K. *A prospective longitudinal study of observation versus surgical intervention in the management of necrotizing pancreatitis* **American Journal of Surgery** 1991; 161: 19-25
- 4.- Widdison A., Karanjia N. *Pancreatic infection complicating acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 1993; 80: 148-54
- 5.- Kylänpää-Bäck ML., Kemppainen E., Puolakkainen P. *Trypsin-based laboratory methods and carboxipeptidase activation peptide in acute pancreatitis* **JOP. Journal of Pancreas (Online)** 2002; 3(2): 34-48
- 6.- Frossard JL. *Trypsin activation peptide (TAP) in acute pancreatitis: from pathophysiology to clinical usefulness* **JOP. Journal of Pancreas (Online)** 2001; 2(2): 69-77
- 7.- Hirota M., Kuwata K., Ohmuraya M., Ogawa M. *From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene* **JOP. Journal of Pancreas (Online)** 2003; 4(2): 83-88
- 8.- Sakrafas GH., Tsiotou AG. *Ethiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts* **Journal of Clinical Gastroenterology** 2000; 30(4): 343-56
- 9.- Tukiainen E., Kylanpaa ML., Kemppainen E., Nevanlinna H., Paju A., Repo H., Stenman UH., Puolakkainen P. *Pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene mutations in patients with acute pancreatitis* **Pancreas** 2005; 30 (3): 239-42
- 10.- Acosta JM., Pellegrin CA., Skinner DB. *Etiology and patogénesis of acute biliary pancreatitis* **Surgery** 1980; 88: 118-25
- 11.- Ko CW., Lee SP. *Biliary sludge and cholecystitis* **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** 2003; 17(3): 383-396
- 12.- McCutcheon AD. *Neurological damage and duodenopancreatic reflux in the pathogenesis of alcoholic pancreatitis* **Archives of Surgery** 2000; 135(3): 278-85
- 13.- Yadav D., Pitchumoni CS. *Issues in hyperlipidemic pancreatitis* **Journal of Clinical Gastroenterology** 2003; 36(1): 54-62
- 14.- Anagnostopoulus GK., Tsiakos S., Margantinis G., Kostopoulos P., Arvanitidis D. *Acute pancreatitis due to pravastatin therapy* **JOP Journal of Pancreas (Online)** 2003; 4(3): 129-132
- 15.- Dassopoulos T., Ehrenpreis ED., *Acute pancreatitis immunodeficiency virus-infected patients: a review* **American Journal of Medicine** 1999; 107(1): 78-84
- 16.- Makins R, Ballinger A. *Gastrointestinal side effects of drugs* **Expert Opinion in Drug Safety** 2003; 2(4):421-9.
- 17.- Parenti DM., Steinberg W., Kang P. *Infectious causes of acute pancreatitis* **Pancreas** 1996; 13(4): 356-71
- 18.- Mishra A., Saigal S., Gupta R., Sarin SK. *Acute pancreatitis associated with viral hepatitis: a report of six cases with review of literature* **American Journal of Gastroenterology** 1999; 94(8): 2292-5
- 19.- Yuen MF, Chan TM, Hui CK, Chan AO, Ng IO, Lai CL. *Acute pancreatitis complicating acute exacerbation of chronic hepatitis B infection carries a poor prognosis* **Journal of Viral Hepatitis** 2001; 8(6):459-64
- 20.- Uchida K, Okazaki K, Konishi Y, Ohana M, Takakuwa H, Hajiro K, Chiba T *Clinical analysis of autoimmune-related pancreatitis* **American Journal of Gastroenterology** 2000; 95(10): 2788-94
- 21.- Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, Matsushida Y, Katamura K, Ohmori K, Chiba T. *Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and Th1/Th2-type cellular immune response* **Gastroenterology** 2000; 118: 573-81
- 22.- Kloppel G, Luttges J, Lohr M, Zamboni G, Longnecker D. *Autoimmune pancreatitis: pathological, clinical, and immunological features* **Pancreas** 2003; 27(1): 14-9

- 23.- Kim HJ., Kim MH., Bae JS., Lee SS., Seo DW., Lee SK. *Idiopathic acute pancreatitis* **Journal of Clinical Gastroenterology** 2003; 37(3): 238-50
- 24.- Kamisawa T., Egawa N., Matsumoto G., Tsuruta K., Okamoto A. *Pancreatographic findings in idiopathic acute pancreatitis* **Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery** 2005; 12 (1): 99-102
- 25.- Keim V., Teich N., Fiedler F. et al. *A comparison of lipase and amylase in the diagnosis of acute pancreatitis in patients with abdominal pain* **Pancreas** 1998; 16: 45-9
- 26.- Sandberg AA, Borgström A *Early prediction of severity in acute pancreatitis. Is this possible?* **Journal of Pancreas (On line)** 2002; 3 (5): 116-125
- 27.- Kylanpaa-Back ML., Repo H., Kempainen E. *New laboratory tests in acute pancreatitis* **Addiction Biology** 2002 7(2): 181-90
- 28.- Balthazar E., Robinson D., Megibow A., Ranson J. *Acute pancreatitis. Value of CT in establishing prognosis* **Radiology** 1990; 174: 331-6
- 29.- Elmas N *The role of diagnostic radiology in pancreatitis* **European Journal of Radiology** 2001; 38: 120-132
- 30.- Hwang T., Chang K., Ho Y. *Contrast enhanced dynamic computed tomography does not aggravate the clinical severity of patients with severe acute pancreatitis: reevaluation of the effect of intravenous contrast medium on the severity of acute pancreatitis* **Archives of Surgery** 2000; 135(3): 287-90
- 31.- Ranson JHC. *The timing of biliary surgery in acute pancreatitis* **Annual Surgery** 1979; 189:654-663
- 32.- De Bernardinis M., Violi V., Roncoroni L. et al. *Discriminant power and information content of Ranson's prognosis signs in acute pancreatitis; a meta-analytic study* **Critical Care Medicine** 1999; 27(10): 2272-83
- 33.- Blamey SL, et al. *Prognostic factors in acute pancreatitis* **Gut** 1984; 25: 1340-1346
- 34.- Knaus WA et al *APACHE II: a severity of disease classification system* **Critical Care Medicine** 1985;13(10): 818-29
- 35.- Wilson C., Heath D., Imrie C. *Prediction of outcome in acute pancreatitis: a comparative study of APACHE II, clinical assesment and multiple factor scoring systems* **British Journal of Surgery** 1990; 77: 1260-4
- 36.- Bradley EL 3rd et al *A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992* **Archives of Surgery** 1993; 128(5): 586-90
- 37.- Rau B., Schilling MK., Berger HG. *Laboratory markers of severe acute pancreatitis* **Digestive Disease** 2004; 22 (3): 247-57
- 38.- Barauskas G, Svagzdys S, Maleckas A. *C-reactive protein in early prediction of pancreatic necrosis* **Medicina (Kaunas)**. 2004;40(2):135-40
- 39.- Werner J, Hartwig W, Uhl W, Muller C, Buchler MW. *Useful markers for predicting severity and monitoring progression of acute pancreatitis* **Pancreatology**. 2003;3(2):115-27.
- 40.- Lempinen M, Stenman UH, Finne P, Puolakkainen P, Haapiainen R, Kempainen E. *Trypsinogen-2 and trypsinogen activation peptide (TAP) in urine of patients with acute pancreatitis* **Journal of Surgical Research** 2003; 111 (2): 267-73
- 41.- Simovic MO., Bonham MJ., Abu-Zidan FM., Windsor JA. *Anti-inflammatory cytokine response and clinical outcome in acute pancreatitis* **Critical Care Medicine** 1999; 27(12): 2662-5
- 42.- Mentula P., Kylanpaa ML., Kempainen E., Jansson SE., Sarna S., Puolakkainen P., Haapiainen R., Repo H. *Plasma anti-inflammatory cytokines and monocyte human leucocyte antigen-DR expresión in patients with acute pancreatitis* **Scandinavian Journal of Gastroenterology** 2004; 39: 178-87
- 43.- Mentula P., Kylanpaa ML., Kempainen E., Jansson SE., Sarna S., Puolakkainen P., Haapiainen R., Repo H. *Early prediction of organ failure by combined markers in patients with acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2005; 92 (1): 68-75
- 44.- Demols A., Deviere J. *New frontiers in the pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: the cytokines* **Journal of Pancreas On Line** 2003; 4: 49-57

- 45.- Andersen J., Hedström J., Kempainen E., Finne P., Puolakkainen P., Stenman UH. *The ratio of trypsin-2-alpha(1)-antitrypsin to trypsinogen-1 discriminate alcohol-induced acute pancreatitis* **Clinical Chemistry** 2001; **47**:231-6
- 46.- Kempainen E., Mayer J., Puolakkainen P., Raraty M., Slavin J., Neoptolemos JP. *Plasma trypsinogen activation peptide in patients with acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2001; **88**:679-80
- 47.- Johnson CD., Lempinen M., Imrie CW., Puolakkainen P., Kempainen E., Carter R., McKay C. *Urinary trypsinogen activation peptide as a marker of severe acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2004; **91**: 1027-1033
- 48.- Windsor JA. *Search for prognostic markers for acute pancreatitis* **Lancet** 2000; **355**:1924-5
- 49.- Saez J., Martínez J., Trigo C., Sánchez-paya J., Grino P., Company L., Laveda R., Penalva JC., García C., Pérez-Mateo M. *A comparative study of the activation peptide of carboxypeptidase B and trypsinogen as early predictors of the severity of acute pancreatitis* **Pancreas** 2004; **29** (1): e9-14
- 50.- Liu ZS, Jiang CQ, Qian Q, Sun Q, Fan LF, Ai ZL. *Early prediction of severe acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide* **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International** 2002; **1** (2): 285-9
- 51.- Pezzilli R., Morselli-Labate A., Barbieri A., Platè L. *Clinical usefulness of the serum carboxypeptidase B activation peptide in acute pancreatitis* **J Pancreas (Online)** 2000; **1** (3): 58-68
- 52.- Clavien PA., Robert J., Meyer P., Borst F., Hauser H. *Acute pancreatitis and normoamylasemia. Not an uncommon combination* **Annals of Surgery** 1989; **210**:614-20
- 53.- Yadav D., Agarwal N., Pitchumoni CS. *A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis* **American Journal of Gastroenterology** 2002; **97** (6): 1309-18
- 54.- Hedström J., Kempainen E., Andersen J., Jokela H., Puolakkainen P., Stenman UH. *A comparison of serum trypsinogen-2 and trypsin-2alpha1-antitrypsin complex with lipase and amylase in the diagnosis and assessment of severity in the early phase of acute pancreatitis* **American Journal of Gastroenterology** 2001; **96**: 424-30
- 55.- Chen YT., Chen CC., Wang SS., Chang FY., Lee SD *Rapid urinary trypsinogen-2 test strip in the diagnosis of acute pancreatitis* **Pancreas** 2005; **30** (3): 243-7
- 56.- Brisinda G., Maria G., Ferrante A., Civello I. *Evaluation of prognostic factors in patients with acute pancreatitis* **Hepatogastroenterology** 1999; **46**:1990-7
- 57.- Toh S., Phillips S., Johnson C. *A prospective audit against management of acute pancreatitis in the south of England* **Gut** 2000; **46**:239-43
- 58.- Garg PK., Madan K., Pande GK., Khanna S., Sathyanarayan G., Bohidar NP., Tandon RK. *Association of extent and infection of pancreatic necrosis with organ failure and death in acute necrotizing pancreatitis* **Clinical Gastroenterology & Hepatology** 2005; **3** (2): 159-66
- 59.- Johnson CD., Abu-Hilal M. *Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis* **Gut** 2004; **53**(9): 1340-4
- 60.- Papachristou GI., Whitcomb DC. *Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis* **Clinics in Laboratory Medicine** 2005; **25** (1): 17-37
- 61.- Ammori BJ., Boreham B., Lewis P., Roberts SA. *The biochemical detection of biliary etiology of acute pancreatitis on admission: a revisit in the modern era of biliary imaging* **Pancreas** 2003; **26** (2): e32-5
- 62.- Dholakia K., Pitchumoni CS., Agarwal N. *How often are liver function tests normal in acute biliary pancreatitis?* **Journal of Clinical Gastroenterology** 2004;**38**(1):81-3
- 63.- Yeung YP, Lo SF, Yip AW. *Role of ERCP in the management of predicted mild acute biliary pancreatitis* **Asian Journal of Surgery** 2003; **26**(4):197-201
- 64.- Carr-Locke DL. *Biliary pancreatitis* **Can Journal of Gastroenterology** 2003;**17**(3):205-8
- 65.- Vazquez-Iglesias JL., Gonzalez-Conde B., Lopez-Roses L., Estévez-Prieto E., Alonso-Aguirre P., Lancho A., Suarez FF., Nunes R. *Endoscopic sphincterotomy for prevention of the recurrence of acute biliary pancreatitis in patients with gallbladder in situ: long-term follow-up of 88 patients* **Surgical Endoscopy** 2004; **18**(10): 1442-6

- 66.- Moody F., Haley-Russell D., Muncy D. *Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis* **Digestive and Disease Science** 1995; 40: 1798-804
- 67.- Powell J., Miles R., Siriwardena A. *Review: Antibiotic prophylaxis in the initial management of severe acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 1998; 85: 582-7
- 68.- Rau B., Steinbach G., Gansauge F., et al. *The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis* **Gut** 1997; 41: 832-40
- 69.- Ugarte H., Silva E., Mercan D., et al. *Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit* **Critical Care Medicine** 1999; 27: 498-504
- 70.- Olah A., Belagyi T., Issekutz A., Makay R., Zaborszky A. *Value of procalcitonin quick test in the differentiation between sterile and infected forms of acute pancreatitis* **Hepatogastroenterology** 2005; 52(61): 243-5
- 71.- Isenmann R., Rau B., Kron M., Beger HG. *A rationale for a revised classification of severe acute pancreatitis* **Pancreas** 2001; 23: 443. abstract
- 72.- Beger HG., Isenmann R. *Surgical management of necrotizing pancreatitis* **Surgical Clinics of North America** 1999; 79: 783-800
- 73.- Isenmann R., Rau B., Beger HG. *Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis* **British Journal of Surgery** 1999; 86: 1020-1024
- 74.- Tsiotos GG., Luque-de Leon E., Søreide JA et al. *Management of necrotizing pancreatitis by repeated operative necrosectomy using a zipper technique* **American Journal of Surgery** 1998; 175: 91-98
- 75.- Buter A., Imrie CW., Carter CR et al. *Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2002; 89: 298-302
- 76.- Isenmann R., Rau B., Beger HG. *Early severe acute pancreatitis—characteristics of a new subgroup* **Pancreas** 2001; 22: 274-278
- 77.- Isenmann R., Henne-Bruns D., Adler G. *Shock and acute pancreatitis* **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** 2003; 17 (3): 345-355.
- 78.- Maryele J., Simon P., Lerch MM. *Medical treatment of acute pancreatitis* **Gastroenterology Clinics in North America** 2004; 33 (4): 855-869
- 79.- Tenner S. *Initial management of acute pancreatitis: critical issues during the first 72 hours* **American Journal of Gastroenterology** 2004; 99: 2489-2494
- 80.- Malangoni MA., Martin AS. *Outcome of severe acute pancreatitis* **American Journal of Surgery** 2005; 189: 273-277
- 81.- Kalfarentzos F., Kehagias J., Mead N., et al. *Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial* **British Journal of Surgery** 1997; 84: 1665 – 9
- 82.- Windsor A., Kanwar S., Li A., et al. *Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis* **Gut** 1998; 42: 431 – 5
- 83.- Delcenserie R., Yzet T., Ducroix J. *Prophylactic antibiotics in treatment of severe acute alcoholic pancreatitis* **Pancreas** 1996; 13: 198 – 201
- 84.- Sainio V., Kempainen E., Puolakkainen P., et al. *Early antibiotic treatment in acute necrotizing pancreatitis* **Lancet** 1995; 346: 663 – 7
- 85.- Powell J., Miles R., Siriwardena A. *Review: Antibiotic prophylaxis in the initial management of severe acute pancreatitis* **British of Journal Surgery** 1998; 85: 582 – 7
- 86.- Luiten E., Hop W., Lange J., et al. *Controlled clinical trial of selective decontamination for the treatment of severe acute pancreatitis* **Annals of Surgery** 1995; 222: 57 – 65
- 87.- Nathens A., Marshall J. *Selective decontamination of the digestive tract in surgical patients* **Archives of Surgery** 1999; 134: 170 – 6
- 88.- Glazer G., Mann D. *British Society of Gastroenterology. United Kingdom guidelines for the management of acute pancreatitis* **Gut** 1998; 42 (Suppl 2): S1 – S13.
- 89.- Dervenis C., Bassi C. *Evidence based assessment of severity and management of acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2000; 87: 257 – 8

- 90.- Kelly TR., Wagner DS. *Gallstone pancreatitis: a prospective randomized trial of the timing of surgery* **Surgery** 1988; **104**: 600-5
- 91.- Pellegrini CA. *Surgery for gallstone pancreatitis* **American Journal of Surgery** 1993; **165**: 515-8
- 92.- Folsch U., Nitsche R., Ludtke R., et al. *Gallstone pancreatitis. The role of preoperative ERCP* **New England Journal of Medicine** 1997; **336**: 237 – 42
- 93.- Sharma V., Howden C. *Meta – analysis of randomized controlled trials of endoscopic retrograde cholangiography and endoscopic sphincterotomy for the treatment of acute biliary pancreatitis* **American Journal of Gastroenterology** 1999; **94**:3211–4
- 94.- Pezzilli R., Romboli E., Campana D., Corinaldesi R. *Mechanisms involved in the onset of post-ERCP pancreatitis* **JOP. J. Pancreas** 2002; **3**: 162-168.
- 95.- McFadden D., Reber H. *Indications for surgery in severe acute pancreatitis* **International Journal of Pancreatology** 1994; **15**: 83 – 90
- 96.- Büchler P., Reber H. *Surgical approach in patients with acute pancreatitis. Is infected or sterile necrosis an indication-in whom should this be done, when and why?* **Gastroenterology Clinics of North America** 1999; **28**: 661 – 71.
- 97.- Sabater L., Calvete J., Lledó S. *Pancreatitis Aguda. Decisiones terapéuticas: cirugía y esfinterotomía endoscópica* **GH continuada** 2002; **1**: 226-231
- 98.- Seta T., Noguchi Y., Shimada T., Shikata S., Fukui T. *Treatment of acute pancreatitis with protease inhibitors: a meta-analysis* **European Journal of Gastroenterology & Hepatology** 2004; **16** (12): 1287-93
- 99.- Berling R., Borgstrom A., Ohlsson K. *Peritoneal lavage with aprotinin in patients with severe acute pancreatitis. Effects on plasma and peritoneal levels of trypsin and leukocyte proteases and their major inhibitors* **International Journal of Pancreatology** 1998; **24**: 9 – 17
- 100.- Berling R., Ohlsson K. *Effects of high dose intraperitoneal aprotinin treatment on complement activation and acute phase response in acute severe pancreatitis* **Journal of Gastroenterology** 1996; **31**: 702 – 5
- 101.- Pederzoli P., Cavallini G., Falconi M et al. *Gabexate mesilate versus aprotinin in human acute pancreatitis. A prospective, randomized, double blind multicenter study* **International Journal of Pancreatol ogy** 1993; **14**: 117 – 24
- 102.- Mariani A. *Pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: which therapy is best?* **JOP J. Pancreas** 2003; **4**: 68-74
- 103.- Tsujino T., Komatsu Y., Isayama H., Hirano K., Sasahira N., Yamamoto N., Toda N., Ito Y., Nakai Y., Tada M., Matsumura M., Yoshida H., Kawabe T., Shiratori Y., Omata M. *Ulinastatin for pancreatitis after endoscopic retrograde cholangio-pancreatography: a randomized, controlled trial* **Clinical Gastroenterology and Hepatology** 2005; **3** (4): 376-383
- 104.- Maciejewski R., Burdan F., Burski K., Madej B., Ziemiakowicz R., Dabrowski A., Wallner G. *Selected biochemical parameters and ultrastructural picture of pancreas due to Ulinastatin treatment of experimental acute pancreatitis* **Experimental Toxicologic Pathology** 2005; **56** (4-5): 305-311
- 105.- Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Sakurai M., Yoshino S., Sato H., Yoshikawa T. *Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide* **Molecular Pharmacology** 2005; **67** (3): 673-80
- 106.- Keck T., Balcom JH., Antoniu BA., Lewandrowski K., Warahaw AL., Fernández-del-Castillo C. *Regional effects of nafamostat, a novel potent protease and complement inhibitor, on severe necrotizing pancreatitis* **Surgery** 2001; **130**: 175-81
- 107.- Imaizumi H., Kida M., Nishimaki H., Okuno J., Kataoka Y., Kida Y., Soma K., Saigenji K. *Efficacy of continuous regional arterial infusion of a protease inhibitor and antibiotic for severe acute pancreatitis in patients admitted to an intensive care unit* **Pancreas** 2004; **28** (4): 369-73
- 108.- Mikami Y., Takeda K., Matsuda K., Qiu-Feng H., Fukuyama S., Egawa S., Sunamura M., Matsuno S. *Rat experimental model of continuous regionalarterial infusion of protease inhibitor and its effects on severe acute pancreatitis* **Pancreas** 2005 **30**(3): 248-53
- 109.- Nathan JD., Romac J., Peng RY., Peyton M., Macdonald RJ., Liddle RA. *Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-I ameliorates secretagogue-induced pancreatitis in mice* **Gastroenterology** 2005; **128**: 717-727

- 110.- Andoh A., Hata K., Shimada M., Fujino S., Tasaki K., Bamba S., Araki Y., Fujiyama Y., Bamba T. *Inhibitory effects of somatostatin on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts* **International Journal of Molecular Medicine** 2002; 10: 89-93
- 111.- Nikou GC., Giamarellos-Bourboulis EJ., Grecka P., Toumpanakis CH., Giannikopoulos G., Katsilambros N. *Effect of octreotide administration on serum interleukin-6 (IL6) levels of patients with acute edematous pancreatitis* **Hepato-gastroenterology** 2004; 51 (56): 599-602
- 112.- Andriulli A., Leandro G., Clemente R., et al. *Meta - analysis of somatostatin, octreotide and gabexate mesilate in the therapy of acute pancreatitis* **Aliment Pharmacol Ther** 1998; 12: 237 - 45
- 113.- Poon RT., Fan ST. *Antisecretory agents for prevention of post-ERCP pancreatitis: rationales for use and clinical results* **JOP J. Pancreas** 2003; 4: 33-40
- 114.- Karakoyunlar O., Sivrel E., Tanir N., et al.: *High dose octreotide in the management of acute pancreatitis* **Hepatogastroenterology** 1999; 46: 1968 - 72
- 115.- Kingsnorth A., Galloway S., Formela L. *Randomized, double blind phase II trial of lexipafant, a platelet activating factor antagonist, in human pancreatitis* **British Journal of Surgery** 1995; 82: 1414 - 20
- 116.- McKay C., Curran F., Sharples C., et al. *Prospective placebo controlled randomized trial of lexipafant in predicted severe acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 1997; 84: 1239 - 43
- 117.- Pfutzer RH., Whitcomb DC. *Acute pancreatitis* **Current Opinion in Gastroenterology** 2000; 16: 410-413
- 118.- Lane JS., Todd KE., Gloor B., Chandler CF., Kau AW., Ashley SW., Reber HA., McFadden DW. *Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis* **Journal of Surgical Research** 2001; 99: 365-370
- 119.- Yamagiwa T., Shimosegawa T., Satoh A., Kimura K., Sakai Y., Masamune A. *Inosine alleviates rat caerulein pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury* **Journal of Gastroenterology** 2004; 39: 41-49
- Introducción: Sistema Inmune**
- 120.- Alvarez-Mon M., Durantez A. *Fisiopatología de las linfocinas y monocinas* **Medicina Clínica (Barcelona)**. 1987; 89: 387-93
- 121.- Janeway.CA., Travers.P., Walport M., Capra D. *Los órganos linfoides periféricos están especializados en atrapar antígeno y facilitar el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas en Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 4ª Ed. Barcelona (España) Masson S.A. 2000; 1-3: pp 7-10*
- 122.- Klein J. *The cell. En natural history of the mayor histocompatibility complex. Ed. Wiley and sons. New York 1986; pp. 291*
- 123.- Nössal GJV. *The basic components of the immune system* **New England Journal of Medicine** 1987; 316: 1320-1325
- 124.- Bach FH., Sachs DH. *Transplantation immunology* **New England Journal of Medicine** 1987; 317: 489-492
- 125.- Malissen B. *Transfer and expresion of MHC genes* **Immunology Today** 1986; 7: 106-112
- 126.- Bjorkman PJ., Saper MA., Samraoui B., Bennet WS., Strominger JL., Wiley DC. *The foreing antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens* **Nature** 1987; 329: 512-517
- 127.- Matzinger P., Zamoyska RA. *A beginner's guide to major histocompatibility complex function* **Nature** 1982; 297: 628
- 128.- Adkins B., Mueller C., Okada CY., Reichert RA., Weissman IL., Spangrude GJ. *Early events in T-cell maturation* **Annual Review in Immunology** 1987; 5: 325-365
- 129.- Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. *Células y Tejidos del sistema inmunitario en Inmunología Celular y Molecular. Anonymous 2ªEd. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. 1995; pp. 15-34*
- 130.- Acuto O., Reinherz EL. *The human T cell receptor: Structure and function* **New England Journal of Medicine** 1985; 2: 1110-1111
- 131.- Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. *Células T: Base molecular de su actividad y del reconocimiento del antígeno en Inmunología Celular y Molecular. Anonymous 2ªEd. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. 1995; pp. 150-183*

- 132.- Konenber M., Siu G., Hood LE., Shastri N. *The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition* **Annal Reviews of Immunology** 1986; 4: 529-91
- 133.- Von Boehmer H. *The selection of the alpha, beta heterodimeric T-cell receptor for antigen* **Immunology Today** 1986; 7: 333-6
- 134.- Allison JP., Lanier LL. *Structure, function and serology of the T-cell antigen receptor complex* **Annual Reviews of Immunology** 1987; 5: 503-40
- 135.- Alt FW., Oltz EM., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. *VDJ recombination* **Immunology Today** 1992; 13: 306-14
- 136.- Wang JH., Reinherz EL. *Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules* **Molecular Immunobiology** 2001; 38: 1039-1049
- 137.- Bauer A., McConkey DJ., Howard FD., Clayton LK., Novick D., Koyasu S. *Differential signal transduction via T-cell receptor CD3 zeta 2, CD3 zeta-eta, and CD3 eta 2 isoforms* **Proceedings of National Academy of Science USA** 1991; 88: 3842-6
- 138.- Kappes DJ., Tonegawa S. *Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex* **Proceedings of National Academy of Science USA** 1991; 88: 10619-23
- 139.- Clevers H., Alarcon B., Wileman T., Terhorst C. *The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble* **Annual Reviews of Immunology** 1988; 6: 629-62
- 140.- Reinherz EL., Scholssman SF. *Regulation of the immune response: inducer and suppressor T-lymphocyte subsets in human beings* **New England Journal of Medicine** 1980; 303: 370-3
- 141.- Parnes JR. *Molecular biology and function of CD4 and CD8* **Advances in Immunology** 1989; 44: 265-311
- 142.- Barber EK., Dasgupta JD., Schlossman SF., Trevillyan JM., Rudd CE. *The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex* **Proceedings of National Academy of Science USA** 1989; 86: 3277-81
- 143.- Ledbetter JA., Deans JP., Aruffo A., Grosmaire LS., Kanner SB., Bolen JB. *CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation* **Current Opinion in Immunology** 1993; 5: 334-40
- 144.- König R. *Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR* **Current Opinion in Immunology** 2002; 14: 75-83
- 145.- Salter RD., Benjamin RJ., Wesley PK., Buxton SE., Garrett TP., Clayberger C. *A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2* **Nature** 1990; 345: 41-6
- 146.- Norment AM., Salter RD., Parham P., Engelhard VH., Littman DR. *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules* **Nature** 1988; 336: 79-81
- 147.- O'Rourke AM., Mescher MF. *The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function* **Immunology Today** 1993; 14: 183-8
- 148.- Cooke MP., Heath AW., Shokat KM., Zeng Y., Finkelman FD., Linsley PS. *Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells* **Journal of Experimental Medicine** 1994; 179: 425-38
- 149.- Burnet FM. **The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity** Anonymous Cambridge, UK. The University Press. 1959
- 150.- Talmadge DW. *Clonal selection theory* **Science** 1959; 129: 1643-8
- 151.- Pike KA., Ratcliffe MJH. *Cell surface immunoglobulin receptors in B cell development* **Seminars in Immunology** 2002; 14: 351-358
- 152.- Kurosaki T. *Regulation of B cell fates by BCR signaling components* **Current Opinion in Immunology** 2002; 14: 341-347
- 153.- Meffre E., Casellas R., Nussenzweig MC. *Antibody regulation of B cell development* **Nature Immunology** 2000; 1: 379-385
- 154.- Alvarez Mon M., Manzano L. *Bases celulares y moleculares del sistema inmunitario en Fisiología Humana* Editor: Tresguerres JAF. 1ªEd. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana. 1992; pp. 394-405
- 155.- Tuaille N., Tucker PW., Capra JD. *V_HDJ_H recombination in a human immunoglobulin heavy chain transgenic minilocus.* **Immunologist** 1995; 3: 269-74
- 156.- Díaz M., Casali P. *Somatic immunoglobulin hypermutation* **Current Opinion in Immunology** 2002; 14: 235-240

- 157.- Bockenstedt LK., Gee RJ., Mamula MJ. *Self-peptides in the initiation of lupus autoimmunity* **Journal of Immunology** 1995; **154**: 3516-24
- 158.- Fearon DT. *The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes* **Current Opinion of Immunology** 1993; **5**: 341-8
- 159.- Janeway CAJ., Bottomly K. *Signals and signs for lymphocyte responses* **Cell** 1994; **76**: 275-85
- 160.- Somoza C., Lanier LL. *T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions* **Research Immunology** 1995; **146**: 171-6
- 161.- Billips LG., Nuñez CA., Bertrand FE., Stankovic AK., Gartland GL., Burrows PD. *Immunoglobulin recombinase gene activity is modulated reciprocally by interleukin 7 and CD19 in B cell progenitors* **Journal of Experimental Medicine** 1995; **182**: 973-82
- 162.- Doody GM., Dempsey PW., Fearon DT. *Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and Fc gamma RIIb1* **Current Opinion in Immunology** 1996; **8**: 378-82
- 163.- Fujimoto M., Poe JC., Hasegawa M., Tedder TF. *CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification* **Immunology Research** 2000; **22**: 281-298
- 164.- Tedder TF., Klejman G., Schlossman SF., Saito H. *Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1)* **Journal of Immunology** 1989; **142**: 2560-8
- 165.- Riley JK., Sliwkowski MX. *CD20: a gene in search of a function* **Seminars in Oncology** 2000; **27**: 17-24
- 166.- Ahearn JM., Fearon DT. *Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21)* **Advance in Immunology** 1989; **46**: 183-219
- 167.- Pochon S., Graber P., Yeager M., Jansen K., Bernard AR., Aubry JP. *Demonstration of a second ligand for the low affinity receptor for immunoglobulin E (CD23) using recombinant CD23 reconstituted into fluorescent liposomes* **Journal of Experimental Medicine** 1992; **176**: 389-97
- 168.- Aubry JP., Pochon S., Graber P., Jansen KU., Bonnefoy JY. *CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production* **Nature** 1992; **358**: 505-7
- 169.- Poe JC., Hasegawa M., Tedder TF. *CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction* **International Reviews in Immunology** 2001; **20**: 739-762
- 170.- Fearon DT., Carroll MC. *Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex* **Annual Reviews in Immunology** 2000; **18**: 393-422
- 171.- Erdei A., Prechl J., Isaak A., Molnar E. *Regulation of B-cell activation by complement receptors CD21 and CD35* **Current Pharm. Des.** 2003; **9**: 1849-1860
- 172.- Barclay AN., Beyers AD., Birkeland ML., Brown MH., Davis SJ., Somoza C. *Section II: The leucocyte antigens en The Leucocyte Antigen Facts Book* Anonymous 3rdEd. London. Academic Press Inc.. 1995; pp. 101-412
- 173.- Richards ML., Katz DH. *Biology and chemistry of low affinity IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23)* **Critical Review in Immunology** 1991; **11**: 65-86
- 174.- Heyman B. *Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors* **Annual in Immunology** 2000; **18**: 709-737
- 175.- Jelinek DF. *Regulation of B lymphocyte differentiation* **Annual Allergy & Asthma Immunology** 2000; **84**: 375-385
- 176.- Ortaldo JR y Herberman RB: *Heterogeneity of Natural Killer cells.* **Annu Rev Immunol** 1984; **2**: 359-94
- 177.- Lanier LL., Phillips JH. *Evidence for three types of human cytotoxic lymphocyte* **Immunology Today** 1986; **7**: 132-4
- 178.- Timonen T., Ortaldo JR., Herberman RB. *Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells* **Journal of Experimental Medicine** 1981; **153**: 569
- 179.- D'Andrea A., Chang C., Franz-Bacon K., McClanahan T., Phillips JH., Lanier LL. *Molecular cloning of NKB1, a natural killer cell receptor for HLA-B allotypes* **Journal of Immunology** 1995; **155**: 2306-10
- 180.- Moretta L. et al. *Activating receptors and coreceptors involved in human natural-killer-cell mediated cytotoxicity* **Annual Review in Immunology** 2001; **19**: 197-223

- 181.-** Biassoni R., Cantoni C., Marras D., Giron-Michel J., Moretta L., Dimasi N. *Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure* **Journal of Cell Molecular Medicine** 2003; **7**: 376-387
- 182.-** Moretta A., Sivori S., Vitale M., Pende D., Morelli L., Augugliaro R. *Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells* **Journal of Experimental Medicine** 1995; **182**: 875-84
- 183.-** Colonna M. *Natural Killer cell receptors specific for MHC class I molecules* **Current Opinion in Immunology** 1996; **8**: 101-7
- 184.-** Farag SS., VanDeusen JB., Fehniger TA., Caligiuri MA. *Biology and clinical impact of human natural killer cells* **International Journal of Hematology** 2003; **78**: 7-17
- 185.-** Diefenbach A. et al *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by the tumor cells and activation of NK cells and macrophages* **Nature Immunology** 2000; **1**: 119-126
- 186.-** Moretta L., Ferlazzo G., Mingari MC., Melioli G., Moretta A. *Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells* **Vaccine** 2003; **21**: S2/38-S2/42
- 187.-** Cooper MA., Fehniger TA., Fuchs A., Colonna M., Caligiuri MA. *NK cell and DC interactions* **TRENDS in Immunology** 2004; **25**: 47-52
- 188.-** Lanier LL. *NK cell receptors* **Annual Reviews of Immunology** 1998; **16**: 359-393
- 189.-** Cooper MA., Fehniger TA., Caligiuri MA. *The biology of human natural killer-cell subsets* **TRENDS in Immunology** 2001; **22**: 633-640
- 190.-** Shibuya A. *Development and functions of natural killer cells* **International Journal of Hematology** 2003; **78**: 1-6
- 191.-** Janeway.CA., Travers.P., Walport M., Capra D. *Células accesorias con receptores Fc en la inmunidad humoral en Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 4ª Ed. Barcelona (España) Masson S.A. 2000; pp 331-338*
- 192.-** Friedl P., Gunzer M. *Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model* **TRENDS in Immunology** 2001; **22**: 187-191
- 193.-** Frauwirth KA., Thompson CB. *Activation and inhibition of T lymphocytes by costimulation* **Journal of Clinical Immunology** 2002; **109**: 295-299
- 194.-** Beutler B. *Innate immunity: an overview* **Molecular Immunology** 2004; **40**: 845-859
- 195.-** Todd RF., Schollossman SF. *Analysis of antigenic determinants on human monocytes and macrophages* **Blood** 1982; **59**: 775-86
- 196.-** Reyes-Martín E., Hernández-Fuentes MP., Prieto-Martín A., Alvarez-Mon M. *Células fagocíticas. Tipos, mecanismo y función* **Editores: Alvarez-Mon M and Ver-López E. Madrid. MEDICINE. 1997; 7ªEd.: pp. 2236-40**
- 197.-** Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. *Citocinas en Inmunología Celular y Molecular 2ªEd. Madrid. Interamericana McGraw-Hill. 1995; pp. 267-92*
- 198.-** Santiago-Schwarz F. *Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage* **Journal of Leukocyte Biology** 1999; **66**: 209-216
- 199.-** Zou GM., Tam YK. *Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances* **European Cytokine Network** 2002; **13**: 186-199
- 200.-** Caux C., Ait-Yahia S., Chemin K., Bouteiller O., Dieu-Nosjean MC., Homey B., Massacrier C., Vanbervliet B., Zlotnik A., Vicari A. *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines* **Springer Seminars in Immunopathology** 2000; **22**: 345-369
- 201.-** Wang B., Amerio P., Sauder DN. *Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration* **Journal of Leukocyte Biology** 1999; **66**: 33-39
- 202.-** McColl SR. *Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance* **Immunology Cell Biology** 2002; **80**: 489-496
- 203.-** Sallusto F., Lanzavecchia A. *Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor* **Immunological Reviews** 2000; **177**: 134-140
- 204.-** Luster AD. *The role of chemokines in linking innate and adaptative immunity* **Current Opinion in Immunology** 2002; **14**: 129-135
- 205.-** Wan Y., Bramson J. *Role of dendritic cell-derived cytokines in immune regulation* **Current Pharmacology Disease** 2001; **7**: 977-992

- 206.- Van Nierop K., de Groot C. *Human follicular dendritic cells: function, origin and development* **Seminars in Immunology** 2002; 14: 251-257
- 207.- Janeway CA., Travers P., Walport M., Capra D. *Producción de anticuerpos por linfocitos B en Immunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 4ª Ed. Barcelona (España) Masson S.A. 2000; pp 309-24*
- 208.- Bishop GA., Hostager BS. *The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons* **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2003; 14: 297-309
- 209.- Von Andrian UH., Mackay CR. *T-cell function and migration. Two side of the same coin* **New England Journal of Medicine** 2000; 343: 1020-1034
- 210.- Delves PJ, Roitt IM. *The Immune System* **New England Journal of Medicine** 2000; 343:108-117
- 211.- Kidd P. *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease* **Alternative Medicine Review** 2003; 8: 223-246
- 212.- Springer TA. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm* **Cell** 1994; 76: 301-314
- 213.- Johnston B., Butcher EC. *Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration* **Seminars in Immunology** 2002; 14: 83-92
- 214.- Smith CW. *Leukocyte-endothelial cell interactions* **Seminars in Hematology** 1993; 30: 45-53
- 215.- Yong K., Khwaja A. *Leukocyte cellular adhesion molecules* **Blood Reviews** 1990; 4: 211-225
- 216.- Mazzone A., Ricevuti G. *Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance* **Haematologica** 1995; 80: 161-175
- 217.- Patarroyo M. *Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue* **Immunobiology** 1994; 191: 474-477
- 218.- Elangbam CS., Qualls CW., Dahlgren RR. *Cell adhesion molecules-update* **Veterinarian Pathology** 1997; 34: 61-73
- 219.- Lo SK., van Seventer GA., Levin SM., Wright SD. *Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands* **Journal of Immunology** 1989; 143: 5031-5
- 220.- Patarroyo M., Prieto J., Rincon J., Timonen T., Lundberg C., Lindbom L., Asjo B., Gahmberg CG. *Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology* **Immunology Reviews** 1990; 114: 67-108
- 221.- Berg LP., James MJ., Alvarez-Iglesias M., Glennie S., Lechler RI., Marelli-Berg FM. *Functional consequences of noncognate interactions between CD4+ memory T lymphocytes and the endothelium* **Journal of Immunology** 2002; 168: 3227-3234
- 222.- Hoflich C., Docke WD., Busch A., Kern F., Volk HD. *CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8+ T cells: effector T cells* **International Immunology** 1998; 10: 1837-1845
- 223.- Hamann D., Baars PA., Rep MH., Hooibrink B., Kerkhof-Garde SR., Klein MR., van Lier RA. *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells* **Journal of Experimental Medicine** 1997; 186: 1407-1418.
- 224.- Patarroyo M., Prieto J., Rincon J., Timonen T., Lundberg C., Lindbom L. *Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology* **Immunology Reviews** 1990; 114: 67-108
- 225.- Arnaout MA. *Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18* **Blood** 1990; 75: 1037-50
- 226.- Diamond MS., Staunton DE., Marlin SD., Springer TA. *Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation* **Cell** 1991; 65: 961-71
- 227.- Kannagi R. *Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes* **Current Opinion in Structural Biology** 2002; 12(5): 599-608
- 228.- Rainer TH. *L-selectin in health and disease* **Resuscitation** 2002; 52: 127-141
- 229.- Rollins BJ. *Chemokines* **Blood** 1997; 90: 909-928
- 230.- Rojo D., Suetomi K., Navarro J. *Structural biology of chemokine receptor* **Biological Research** 1999; 32: 263-272
- 231.- Keane MP., Strieter RM. *Chemokine signaling in inflammation* **Critical Care Medicine** 2000; 28: N13-N26

- 232.- Foxman EF., Campbell JJ., Butcher EC. *Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis* **Journal of Cell Biology** 1997; **139**: 1349-1360
- 233.- Jung S., Littman DR. *Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis* **Current Opinion in Immunology** 1999; **11**: 319-325
- 234.- Rossi D., Zlotnik A. *The biology of chemokines and their receptors* **Annual Review in Immunology** 2000 **18**: 217-242
- 235.- Sallusto F., Mackay R., Lanzavecchia A. *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses* **Annual Review in Immunology** 2000; **18**: 593-620
- 236.- Yoshie O., Imai T., Nomiyama H. *Chemokines in immunity* **Advances in Immunology** 2001; **78**: 57-110
- 237.- Christopherson K., Hromas R. *Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses* **Stem Cells** 2001; **19**: 388-396
- 238.- Luster AD. *Chemokines. Chemotactic cytokines that mediate inflammation* *New England Journal of Medicine* 1998 **12**: 436-445
- 239.- Baggiolini M. *Chemokines in pathology and medicine* **Journal of Internal Medicine** 2001 **250**: 91-104
- 240.- D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., Sinigaglia F. *Chemokine receptors in inflammation: an overview* **Journal of Immunological Methods** 2003; **273**: 3-13
- 241.- Monteclaro FS., Charo IF. *The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1* **Journal of Biological Chemistry** 1997; **272**: 23186-23190
- 242.- Han KH., Green SR., Tangirala RK., Tanaka S., Quehenberger O. *Role of the first extracellular loop in the functional activation of CCR2* **Journal of Biological Chemistry** 1999; **274**: 32055-32062
- 243.- Nieto M., Frade JMR., Sancho D., Mellado M., Martinez-A., Sánchez-Madrid F. *Polarization of chemokine receptor to the leading edge during lymphocyte chemotaxis* **Journal of Experimental Medicine** 1997; **186**: 153-158
- 244.- Rodríguez-Frade JM., Vila-Coro AJ., Martín de Ana A., Albar P., Martínez-A C., Mellado M. *The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2* **Proceedings of National Academy of Science** 1999; **96**: 3628-3633
- 245.- Mellado M., Rodríguez-Frade JM., Aragay A., del Real G., Martín AM., Vila-Coro AJ., Serrano A., Mayor F., Martínez-A C. *The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor* **Journal of Immunology** 1998; **161**: 805-813
- 246.- Tanaka S., Green SR., Quehenberger O. *Differential expression of the isoforms for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, CCR2, in monocytes* **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2002; **290**: 73-80
- 247.- Aragay AM., Mellado M., Frade JMR., Martín AM., Jiménez-Sainz AM., Martínez A C., Mayor F. *Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2* **Proceedings of National Academy of Science** 1998; **95**: 2985-2990
- 248.- del Pozo MA., Sánchez-Mateos P., Nieto M., Sánchez-Madrid F. *Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway* **Journal of Cell Biology** 1995; **131**: 495-508
- 249.- Franci C., Gosling J., Tsou CL., Coughlin SR., Charo IF. *Phosphorylation by a G protein-coupled kinase inhibits signaling and promotes internalization of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor* **Journal of Immunology** 1996; **157**: 5606-5612
- 250.- Horuk R. *Chemokine receptors* **Cytokine and Growth Factor Reviews** 2001; **12**: 313-335
- 251.- Sica A., Sacconi A., Borsatti A., Power CA., Wells TNC., Luini W., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. *Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes* **Journal of Experimental Medicine** 1997; **185**: 969-974
- 252.- Penton-Rol G., Polentarutti N., Luini W., Borsatti A., Mancinelli R., Sica A., Sozzani S., Mantovani A. *Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN- γ* **Journal of Immunology** 1998; **160**: 3869-3873

- 253.-** Fantuzzi L., Borghi P., Ciolli V., Pavlakis G., Belardelli F., Gessani S. *Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response* **Blood** 1999; **94**: 875-883
- 254.-** Weber C., Belge KU., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber KSC., Ziegler-Heitbrock HWL. *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations* **Journal of Leukocyte Biology** 2000; **67**: 699-704
- 255.-** Frade JMR., Mellado M., del Real G., Gutierrez-Ramos JC., Lind P., Martínez-A C. *Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells* **Journal of Immunology** 1997; **159**: 5576-5584
- 256.-** Loetscher P., Seitz M., Baggiolini M. *Interleukine-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes* **Journal of Experimental Medicine** 1996; **184**: 569-577
- 257.-** Rabin RL., Park MK., Liao F., Swofford R., Stephany D., Farber JM. *Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling* **Journal of Immunology** 1999; **162**: 3840-3850
- 258.-** Sallusto F., Kremmer E., Palermo B., Hoy A., Ponath P., Qin S., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. *Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells* **European Journal of Immunology** 1999; **29**: 2037-2045
- 259.-** Polentarutti N., Allavena P., Bianchi G., Giardina G., Basile A., Sozzani S., Mantovani A., Introna M. *IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells* **Journal of Immunology** 1997; **158**: 2689-2694
- 260.-** Inngjerdigen M., Damaj B., Maghazachi AA. *Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells* **Blood** 2001; **97**: 367-375
- 261.-** Nieto M., Navarro F., Perez-Villar JJ., del Pozo MA., González-Amaro R., Mellado M., Frade JMR., Martínez-A C., López-Botet M., Sánchez-Madrid F. *Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions* **Journal of Immunology** 1998; **161**: 3330-3339
- 262.-** Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay CR., Qin S., Lanzavecchia A. *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation* **European Journal of Immunology** 1998; **28**: 2760-2769
- 263.-** Vanbervliet B., Homey B., Durand I., Massacrier C., AitYahia S., de Bouteiller O., Vicari A., Caux C. *Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces* **European Journal of Immunology** 2002; **32**: 231-242
- 264.-** Weber KSC., Nelson PJ., Gröne HJ., Weber C. *Expression of CCR2 by endothelial cells. Implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium* **Arteriosclerosis & Thrombosis Vascular Biology** 1999; **19**: 2085-2093
- 265.-** Gerard C., Rollins BJ. *Chemokines and disease* **Nature Immunology** 2001; **2**: 108-115
- 266.-** Owen C. *Chemokine receptors in airway disease: which receptors to target?* **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics** 2001; **14**: 193-202
- 267.-** Raport CJ., Gosling J., Schweickart VL., Gray PW., Charo IF. *Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α* **Journal of Biological Chemistry** 1996; **271**: 17161-17166
- 268.-** Samson M., LaRosa G., Libert F., Paindavoine P., Detheux M., Vassart G., Parmentier M. *The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity* **Journal of Biological Chemistry** 1997; **272**: 24934-24941
- 269.-** Weber C., Weber KSC., Klier C., Wank R., Horuk R., Nelson PJ. *Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T_H1-like/CD45RO⁺ T cells* **Blood** 2001; **97**: 1144-1146
- 270.-** Sallusto F., Lanzavecchia A., Mackay CR. *Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses* **Immunology Today** 1998 **19**(12): 568-574
- 271.-** Annunziato F., Cosmi L., Galli G., Beltrame C., Romagnani P., Manetti R., Romagnani S., Maggi E. *Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo* **Journal of Leukocyte Biology** 1999 **65**: 691-699

- 272.- Kim CH., Rott L., Kunkel EJ., Genovese MC., Andrew DP., Wu L., Butcher EC *Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo* **Journal of Clinical Investigation** 2001 108(9): 1331-1339
- 273.- Ebert LM., McColl SR. *Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4+ T lymphocytes* **Journal of Immunology** 2002; 168: 65-72
- 274.- Kunkel EJ., Boisvert J., Murphy K., Vierra MA., Genovese MC., Wardlaw AJ., Greenberg HB., Hodge MR., Butcher EC., Campbell JJ. *Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes* **American Journal of Pathology** 2002; 160: 347-355
- 275.- BleulCC., Wu L., Hoxie JA., Spinger TA., Mackay CR. *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes* **Proceedings of National Academy of Science USA** 1997; 94: 1925-1930
- 276.- Hariharan D., Douglas SD., Lee B., Lai JP., Campbell DE., Ho WZ. *Interferon- γ upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes* **Blood** 1999; 93: 1137-1144
- 277.- Houle M., Thivierge M., Le Gouill C., Stanková J., Rola-Pleszczynski M. *IL-10 up-regulates CCR5 gene expression in human monocytes* **Inflammation** 1999; 23: 241-251
- 278.- Rosu-Myles M., Khandaker M., Wu DM., Keeney M., Foley SR., Howson-Jan K., Yee IC., Fellows F., Kelvin D., Bhatia M. *Characterization of chemokine receptors expressed in primitive blood cells during human hematopoietic ontogeny* **Stem Cell** 2000; 18: 374-381
- 279.- Lee B., Sharron M., Montaner LJ., Weissman D., Doms RW. *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages* **Proceedings of National Academy of Science USA** 1999; 96: 5212-5220
- 280.- Kennedy KJ. Karpus WJ. *Role of chemokines in the regulation of Th1/Th2 and autoimmune encephalomyelitis* **Journal of Clinical Immunology** 1999; 19: 273-279
- 281.- Patel DD., Zachariah JP., Whichard LP. *CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium* **Clinical Immunology** 2001; 98: 39-45
- 282.- Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Florio T., Schettini G. *Chemokines and their receptors in the central nervous system* **Frontiers in Neuroendocrinology** 2001; 22: 147-184
- 283.- McDermott DH., Murphy PM. *Chemokines and their receptors in infectious disease* **Springer Seminars in Immunopathology** 2000; 22: 393-415
- 284.- Mueller A., Strange PG. *The chemokine receptor, CCR5* **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 2004; 36: 35-38
- 285.- Ruibal-Ares BH., Belmonte L., Bare PC., Parodi CM., Massud I., de Bracco MM. *HIV-1 infection and chemokine receptor modulation* **Current HIV Research** 2004; 2: 39-50
- 286.- Schutyser E., Struyf S., Van Damme J. *The CC Chemokine CCL20 and its receptor CCR6* **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2003; 14: 409-426
- 287.- LiaoF., Rabin RL., Smith CR., Sharma G., Nutman TB., Farber JM. *CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 α* **Journal of Immunology** 1999; 162: 186-194
- 288.- Krzysiek R., Lefevre EA., Bernard J., Foussat A., Galanau P., Louache F., Richard Y. *Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in human B cells* **Blood** 2000; 96: 2338-2345
- 289.- Wehrli N., Legler DF., Finke D., Toellner KM., Loetscher P., Baggiolini M., MacLennan ICM., Acha-Orbea H. *Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes* **European Journal of Immunology** 2001; 31: 609-616
- 290.- Bowman EP., Campbell JJ., Soler D., Dong Z., Manlongat N., Picarella D., Hardy RR., Butcher EC. *Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation* **Journal of Experimental Medicine** 2000; 191: 1303-1317
- 291.- Carramolino L., Kremer L., Goya I., Varona R., Buesa JM., Gutierrez J., Zaballos A., Martinez-A C., Marquez G. *Down-regulation of the β -chemokine receptor CCR6 in dendritic cells by TNF- α and IL4* **Journal of Leukocyte Biology** 1999; 66: 837-844

- 292.-** Iwasaki A., Kelsall BL. *Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine* **Journal of Experimental Medicine** **2000**; **191**: 1381-1393
- 293.-** Dieu MC., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon JM., Oldham E., Ait-Yahia S., Brière F., Zlotnik A., Lebecque S., Caux C. *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites* **Journal of Experimental Medicine** **1998**; **188**: 373-386
- 294.-** Cook DN., Prosser DM., Forster R., Zhang J., Kuklin NA., Abbondanzo SJ., Niu XD., Chen SC., Manfra DJ., Wiekowski MT., Sullivan LM., Smith SR., Greenberg HB., Narula SK., Lipp M., Lira SA. *CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue* **Immunity** **2000**; **12**: 495-503
- 295.-** Loetscher P., Pellegrino A., Gong JH., Mattioli I., Loetscher M., Bardi G., Baggiolini M., Clark-Lewis I. *The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, and IP10, are natural antagonists for CCR3* **Journal of Biological Chemistry** **2001**; **276**: 2986-2991
- 296.-** Romagnani P., Annunziato F., Lazzeri E., Cosmi L., Beltrame C., Lasagni L., Galli G., Francalanci M., Manetti R., Marra F., Vanini V., Maggi E., Romagnani S. *Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) $\alpha\beta^+$ CD8 $^+$ single-positive T cells, TCR $\gamma\delta^+$ T cells, and natural killer-type cells in human thymus* **Blood** **2001**; **97**: 601-607
- 297.-** Loetscher M., Loetscher P., Brass N., Meese E., Moser B. *Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization* **European Journal of Immunology** **1998**; **28**: 3696-3705
- 298.-** Piali L., Weber C., LaRosa G., Mackay CR., Springer TA., Clark-Lewis I., Moser B. *The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig* **European Journal of Immunology** **1998**; **28**: 961-972
- 299.-** Yuan YH., ten Hove T., The FO., Slors JFM., van Deventer SJH., te Velde AA. *Chemokine receptor CXCR3 expression in inflammatory bowel disease* **Inflammatory Bowel Disease** **2001**; **7**: 281-286
- 300.-** Jinquan T., Jing C., Jacobi HH., Malling HJ., Skov PS., Poulsen LK. *CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN- γ -inducible protein-10 and monokine induced by IFN- γ* **Journal of Immunology** **2000**; **165**: 1548-1556
- 301.-** Jinquan T., Quan S., Jacobi HH., Jing C., Millner A., Jensen B., Madsen HO., Ryder LP., Svejgaard A., Malling HJ., Skov PS., Poulsen LK. *CXC chemokine receptor 3 expression on CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon γ -inducible protein 10 and monokine induced by interferon γ* **Blood** **2000**; **96**: 1230-1238
- 302.-** Murdoch C. *CXCR4: chemokine receptor extraordinaire* **Immunological Reviews** **2000**; **177**: 175-184
- 303.-** Bleul CC., Fuhlbrigge RC., Casanovas JM., Aiuti A., Springer TA. *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)* **Journal of Experimental Medicine** **1996**; **184**: 1101-1109
- 304.-** Kim CH., Pelus LM., White JR., Broxmeyer HE. *Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines* **Blood** **1998**; **91**: 4434-4443
- 305.-** Bleul CC., Schultze JL., Springer TA. *B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement* **Journal of Experimental Medicine** **1998**; **187**: 753-762
- 306.-** Voermans C., Rood PML., Hordijk PL., Gerritsen WR., van der Schoot CE. *Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells* **Stem Cell** **2000**; **18**: 435-443
- 307.-** Lataillade JJ., Clay D., Dupuy C., Rigal S., Jasmin., Bourin P., Le Bousse-Kerdilès MC. *Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival* **Blood** **2000**; **95**: 756-768
- 308.-** Rosu-Myles M., Gallacher L., Murdoch B., Hess DA., Keeney M., Kelvin D., Dale L., Ferguson SSG., Wu D., Fellows F., Bhatia M. *The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression* **Proceedings of National Academy of Science** **2000**; **97**: 14626-14631

- 309.-** Gazitt Y. *Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different hematopoietic growth factors* **Stem Cells** **2000; 18: 390-398**
- 310.-** Voermans C., Kooi MLK., Rodenhuis S., van der Lelie H., van der Schoot E., Gerritsen WR. *In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation* **Blood** **2001; 97: 799-804**
- 311.-** Kawabata K., Ujikawa M., Egawa T., Kawamoto H., Tachibana K., Iizasa H., Katsura Y., Kishimoto T., Nagasawa T. *A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution* **Proceedings in National Academy of Sciences** **1999; 96: 5663-5667**
- 312.-** Onai N., Zhang Y., Yoneyama H., Kitamura T., Ishikawa S., Matsushima K. *Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine* **Blood** **2000; 96: 2074-2080**
- 313.-** Kim CH., Broxmeyer HE. *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function* **Journal of Leukocyte Biology** **1999; 65: 6-15**
- 314.-** Ma Qing., Jones D., Springer TA. *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment* **Immunity** **1999; 10: 463-471**
- 315.-** Guinamard R., Signoret N., Masamichi I., Marsh M., Kurosaki T., Ravetch JV. *B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1 α chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4* **Journal of Experimental Medicine** **1999; 189: 1461-1466**
- 316.-** Zamarchi R., Allavena P., Borsetti A., Stievano L., Tosello V., Marcato N., Esposito G., Roni V., Paganin C., Bianchi G., Titti F., Verani P., Gerosa G., Anadori A. *Expression and functional activity of CXCR-4 and CCR-5 chemokine receptors in human thymocytes* **Clinical Experimental Immunology** **2002; 127: 321-330**
- 317.-** Peacock JW., Jirik FR. *TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR* **Journal of Immunology** **1999; 162: 215-223**
- 318.-** Murdoch C., Monk PN., Finn A. *CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells* **Cytokine** **1999; 11: 704-712**
- 319.-** Nagase H., Miyamasu M., Yamaguchi M., Fujisawa T., Ohta K., Yamamoto K., Morita Y., Hirai K. *Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation* **Journal of Immunology** **2000; 164: 5935-43**
- 320.-** Clemetson KJ., Clemetson JM., Proudfoot AEI, Power CA., Baggolini M., Wells TNC. *Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4 and CXCR4 chemokine receptors on human platelets* **Blood** **2000; 96: 4046-4054**
- 321.-** Gear AR., Camerini D. *Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense* **Microcirculation** **2003; 10: 335-350**
- 322.-** Rezaie P., Trillo-Pazos G., Everall IP., Male DK. *Expression of b-chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures* **Glia** **2002; 37: 64-75**
- 323.-** Coughlan CM., McManus CM., Sharron M., Gao ZM., Murphy D., Jaffer S., Choe W., Chen W., Hesselgesser J., Gaylord H., Kalyuzhny A., Lee VM., Wolf B., Doms RW., Kolson DL. *Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons* **Neuroscience** **2000; 97: 591-600**
- 324.-** Balkwill F. *Chemokine biology in cancer* **Seminars in Immunology** **2003; 15: 49-55**
- 325.-** Juarez J., Bendall L. *SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis* **Histology & Hiopathology** **2004; 19: 299-309**
- 326.-** Moser B., Ebert L. *Lymphocyte traffic control by chemokines: follicular B helper T cells* **Immunology Letters** **2003; 83: 105-112**
- 327.-** Schaniel C., Rolink A., Melchers F. *Attractions and migration of lymphoid cells in the organization of humoral immune responses* **Advances in Immunology** **2001; 78: 111-168**
- 328.-** Cyster JG. *Leukocyte migration: scent of the T zone* **Current Biology** **2000; 10: R30-R33**
- 329.-** Moser B., Wolf M., Walz A., Loetscher P. *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control* **TRENDS in Immunology** **2004; 25: 75-84**
- 330.-** Moser B., Loetscher P. *Lymphocyte traffic control by chemokines* **Nature Immunology** **2001; 2: 123-128**

- 331.- Charbonnier AS., Kohrgruber N., Kriehuber E., Stingl G., Rot A., Maurer D. *Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal Langerhans cells* **Journal of Experimental Medicine** 1999; 190: 1755-1767
- 332.- Muller G., Lipp M. *Shaping up adaptative immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking* **Microcirculation** 2003; 10: 325-334
- 333.- Westermann J., Engelhardt B., Hoffmann JC. *Migration of T cells in vivo: molecular mechanisms and clinical implications* **Annals of Internal Medicine** 2001; 135: 279-295
- 334.- Nanki T., Lipsky PE. *Lack of correlation between chemokine receptor and Th1/Th2 cytokine expression by individual memory T cells* **International Immunology** 2000 12(12): 1659-1667
- 335.- Damle NK., Mohagheghpour N., Hansen JA., Engleman EG. *Alloantigen-specific cytotoxic and suppressor T lymphocytes are derived from phenotypically distinct precursors* **Journal of Immunology** 1983; 131: 2296-300
- 336.- Somoza C., Lanier LL. *T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions* **Research Immunology** 1995; 146: 171-6
- 337.- Lindstein T., June CH., Ledbetter JA., Stella G., Thompson CB. *Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway* **Science** 1989; 244: 339-43
- 338.- Schwartz RH. *Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in Interleukin-2 production and immunotherapy* **Cell** 1992; 71: 1065-8
- 339.- Ledbetter JA., Imboden JB., Schieven GL., Grosmaire LS., Rabinovitch PS., Lindsten T. *CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways* **Blood** 1990; 75: 1531-9
- 340.- Abbas AK. *The control of T cell activation vs tolerance* **Autoimmunity Reviews** 2003; 2: 115-118
- 341.- Lanier LL., O'Fallon S., Somoza C., Phillips JH., Linsley PS., Okumura K. *CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL* **Journal of Immunology** 1995; 154: 97-105
- 342.- Greenwald RJ., Latchman YE., Sharpe AH. *Negative co-receptors on lymphocytes* **Current Opinion in Immunology** 2002; 14: 391-396
- 343.- Sansom DM., Manzotti CN., Zheng Y. *What's the difference between CD80 and CD86?* **TRENDS in Immunology** 2003; 24: 313-318
- 344.- Krummel MF., Allison JP. *CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells* **Journal of Experimental Medicine** 1996; 183: 2533-40
- 345.- Walunas TL., Bakker CY., Bluestone JA. *CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation* **Journal of Experimental Medicine** 1996; 183: 2541-50
- 346.- Kariv I., Truneh A., Sweet RW. *Analysis of the site of interaction of CD28 with its counter-receptors CD80 and CD86 and correlation with function* **Journal of Immunology** 1996; 157: 29-38
- 347.- Grewal IS., Flavell RA. *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity* **Annual Review of Immunology** 1998; 16: 111-35
- 348.- van Kooten C., Banchereau J. *CD40-CD40 ligand* **Journal of Leukocyte Biology** 2000; 67: 2-17
- 349.- O'Sullivan B., Thomas R. *CD40 and dendritic cell function* **Critical Review in Immunology** 2003; 23: 83-107
- 350.- Tuma RA., Pamer EG. *Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells* **Current Opinion in Immunology** 2002; 14: 348-353
- 351.- Quezada SA., Jarvinen LZ., Lind EF., Noelle RJ. *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity* **Annual Review of Immunology** 2004; 22: 307-28.
- 352.- Thomas ML. *The leukocyte common antigen family* **Annual Review of Immunology** 1989; 7: 339-69
- 353.- De Jong R., Brouwer M., Miedema F., van Lier RAW. *Human CD8+ T lymphocytes can be divided into CD45RA+ and CD45RO+ with different requirements for activation and differentiation* **Journal of Immunology** 1991; 7: 2088-94

- 354.- Croft M., Bradley LM., Swain SL. *Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells* **Journal of Immunology** 1994; 152: 2675-85
- 355.- Ledbetter JA., Deans JP., Aruffo A., Grosmaire LS., Kanner SB., Bolen JB. *CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation* **Current Opinion in Immunology** 1993; 5: 334-40
- 356.- Fearon DT. *The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes* **Current Opinion in Immunology** 1993; 5: 341-8
- 357.- Sanders ME., Makgoba MW., Shaw S. *Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets* **Immunology Today** 1988; 9: 195-9
- 358.- Sohen S., Rothstein DM., Tallman T., Gaudette D., Schlossman SF., Morimoto C. *The functional heterogeneity of CD8+ cells defined by anti-CD45RA (2H4) and anti-CD29 (4B4) antibodies* **Cell Immunology** 1990; 128: 314-28
- 359.- Akbar AN., Terry L., Timms A., Beverley PC., Janossy G. *Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells* **Journal of Immunology** 1988; 140: 2171-8
- 360.- Kristensson K., Dohlsten M., Fischer H., Ericsson PO., Hedlund G., Sjogren HO. *Phenotypical and functional differentiation of CD4+ CD45RA+ human T cells following polyclonal activation* **Scandinavian Journal of Immunology** 1990; 32: 243-53
- 361.- Johannisson A., Festin R. *Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation* **Cytometry** 1995; 19: 343-52
- 362.- Hamann D., Baars PA., Rep MHG., Hooibrink B., Kerkhof-Garde SR., Klein MR., van Lier RAW. *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells* **Journal of Experimental Medicine** 1997; 9: 1407-1418
- 363.- Höflich C., Döcke WD., Busch A., Kern F., Volk HD. *CD45RA^{bright}/CD11a^{bright} CD8+ T cells: effector T cells* **International Immunology** 1998; 10: 1837-1845
- 364.- Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions* **Nature** 1999; 401: 708-712
- 365.- Hengel RL., Thaker V., Pavlick MV., Metcalf JA., Dennis G., Yang Y., Lempicki RA., Sereti I., Lane HC. *Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen* **Journal of Immunology** 2003; 170: 28-32
- 366.- Campbell JJ., Murphy KE., Kunkel EJ., Brightling CE., Soler D., Shen Z., Boisvert J., Greenberg HB., Vierra MA., Goodman SB., Genovese MC., Wardlaw AJ., Butcher EC., Wu L. *CCR7 expression and memory T cell diversity in human* **Journal of Immunology** 2001; 166: 877-884
- 367.- Faint JM., Annels NE., Curnow SJ., Shields P., Pilling D., Hislop AD., Wu L., Akbar AN., Buckley CD., Moss PAH., Adams DH., Rickinson AB., Salmon M. *Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics* **Journal of Immunology** 2001; 167: 212-220
- 368.- Baars PA., Maurice MM., Rep M., Hooibrink B., van Lier RA. *Heterogeneity of the circulating human CD4+ T cell population. Further evidence that the CD4+CD45RA-CD27- T cell subset contains specialized primed T cells* **Journal of Immunology** 1995; 154: 17-25
- 369.- Gaffen SL. *Signaling domains of the interleukin 2 receptor* **Cytokine** 2001; 14: 63-77
- 370.- Read S., Powrie F. *CD4+ regulatory T cells* **Current Opinion in Immunology** 2001; 13: 644-649
- 371.- Thompson C., Powrie F. *Regulatory T cells* **Current Opinion in Pharmacology** 2004; 4: 408-414
- 372.- Sakaguchi S. *Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses* **Annual Review of Immunology** 2004; 22: 531-562
- 373.- Walzer T., Arpin C., Beloeil L., Marvel J. *Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels* **Journal of Immunology** 2002; 168: 2704-2711
- 374.- Judge AD., Zhang X., Fujii H., Surth CD., Sprent J. *Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells* **Journal of Experimental Medicine** 2002; 196: 935-946
- 375.- Sprent J. *Turnover of memory-phenotype CD8+ T cells* **Microbes and Infection** 2003; 5: 277-231

- 376.- Lund FE., Cockayne DA., Randall TD., Solvason N., Schuber F., Howard MC. *CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction* **Immunological Reviews** 1998; **161**: 79-93
- 377.- Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors* **Leukemia Research** 2001; **25**: 1-12
- 378.- Sconocchia G., Titus JA., Mazzoni A., Visintin A., Pericle F., Hicks SW., Malavasi F., Segal DM. *CD38 triggers cytotoxic responses in activated human natural killer cells* **Blood** 1999; **94**: 3864-3871
- 379.- Tenca C., Merlo A., Zarcone D., Saverino D., Bruno S., De Santana A., Ramarli D., Fabbi M., Pesce C., Deaglio S., Ciccone E., Malavasi F., Grossi CE. *Death of T cell precursors in the human thymus: a role for CD38* **International Immunology** 2003; **15**: 1105-1116
- 380.- Fedele G., Frasca L., Palazzo R., Ferrero E., Malavasi F., Ausiello CM. *CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction* **European Journal of Immunology** 2004; **34**: 1342-1350
- 381.- Mainou-Fowler T., Dignum HM., Proctor SJ., Summerfield GP. *The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)* **Leukemia Lymphoma** 2004; **45**: 455-462
- 382.- Chun TW., Justement S., Sanford C., Hallahan CW., Planta MA., Loutfy M., Kottlil S., Moir S., Kovacs C., Fauci AS. *Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals* **Proceedings of National Academy of Science USA** 2004; **101**: 2464-2469
- 383.- Anderson G., Hare KJ., Jenkinson EJ. *Positive selection of thymocytes: the long and winding road* 1999; **20**: 463-468
- 384.- Ziegler SF., Ramsdell F., Alderson MR. *The activation antigen CD69* **Stem Cells** 1994; **12**: 456-465
- 385.- Marzio R., Maüel J., Betz-Corradin S. *CD69 and regulation of the immune function* **Immunopharmacology and immunotoxicology** 1999; **21**: 565-582
- 386.- Biselli R., Matricardi PM., D'Amelio R., Fattorossi A. *Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes* **Scandinavian Journal of Immunology** 1992; **35**: 439-47
- 387.- Ponka P., Lok CN. *The transferrin receptor: role in health and disease* **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 1999; **10**: 1111-1137
- 388.- Moura IC., Centelles MN., Arcas-Fajardo M., Malheiros DM., Collanw JF., Cooper MD., Monteiro RC. *Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig) A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy* **Journal of Experimental Medicine** 2001; **194**: 417-425
- 389.- Monteiro RC., Moura IC., Launay P., Tsuge T., Haddad E., Benhamou M., Cooper MD., Arcos-Fajardo M. *Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy* **TRENDS in Molecular Medicine** 2002; **8**: 464-468
- 390.- Haddad E., Moura IC., Arcos-Fajardo M., Macher MA., Baudouin V., Alberti C., Loirat C., Monteiro RC., Peuchmaur M. *Enhanced expression of the CD71 mesangial IgA1 receptor in Berger Disease and Henoch-Schönlein nephritis: association between CD71 expression and IgA deposits* **Journal of American Society of Nephrology** 2003; **14**: 327-337
- 391.- Cotner T., Williams JM., Christenson L., Shapiro HM., Strom TB., Strominger J. *Simultaneous Flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content* **Journal of Experimental Medicine** 1983; **157**: 461-72
- 392.- Sun EW., Shi YF. *Apoptosis: the quiet death silences the immune system* **Pharmacology & Therapeutics** 2001; **92**: 135-145
- 393.- Özören N., El-Deiry WS. *Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells* **Seminars in Cancer Biology** 2003; **13**: 135-147
- 394.- Liu H., Pope RM. *The role of apoptosis in rheumatoid arthritis* **Current Opinion in Pharmacology** 2003; **3**: 317-322
- 395.- Medema JP., Borst J. *T cell signaling: a decision of life and death* **Human Immunology** 1999; **60**: 403-411

- 396.- Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family* **Cell** 1993; **75**: 1169-78
- 397.- Suda T., Okazaki T., Naito Y., Yokota T., Arai N., Ozaki S. *Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage* **Journal of Immunology** 1995; **154**: 3806-13
- 398.- Miyawaki T., Uehara T., Nibu R., Tsuji T., Yachie A., Yonehara S. *Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood* **Journal of Immunology** 1992; **149**: 3753-8
- 399.- Moore MA. *Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing* **Journal of Cell Biochemistry Supply** 2002; **38**: 29-38
- 400.- Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory, and effector memory CD4+ T cells* **Journal Experimental Medicine** 2001; **194** (12): 1711-1719
- 401.- Xing Z. *Current understanding of macrophage type 1 cytokine responses during intracellular infections* **Histology and Histopathology** 2000; **15** (1): 199-205
- 402.- Burger D. *Cell contact-mediated signaling of monocytes by stimulated T cells: a major pathway for cytokine induction* **European Cytokine Network** 2000; **11** (3): 346-53
- 403.- Burger D., Dayer JM. *Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF- α production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes* **Annals of New York Academy of Science** 2002; **966**: 464-473
- 404.- Elenkov IJ., Chrousos GP., Wilder RL. *Neuroendocrine regulation of IL12 and TNF- α /IL10 balance. Clinical implications* **Annals of New York Academy of Science**
- 405.- Kourilsky P., Truffa-Bachi P. *Cytokine fields and the polarization of the immune response* **TRENDS in Immunology** 2001; **22**: 502-509
- 406.- Standiford TJ. *Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists* **Current Pharmaceutical Design** 2000; **6** (6): 633-49
- 407.- Ma X. *TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning* **Microbes and Infection** 2001; **3**: 121-129
- 408.- McInnes IB., Gracie JA. *Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases* **Current Opinion in Pharmacology** 2004; **4**: 392-397
- 409.- Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. *Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu* **Cytokine and Growth Factor Reviews** 2001; **12**: 53-72
- 410.- Martin MU., Wesche H. *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family* **Biochimica et Biophysica Acta** 2002; **1592**: 265-280
- 411.- Fitzgerald KA., O'Neill LAJ. *The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence* **Microbes and Infection** 2000; **2**: 933-943
- 412.- Weawe CT., Uname ER. *T cell induction of membrane IL-1 on macrophages* **Journal of Immunology** 1986; **7**: 320-1
- 413.- Dinarello CA. *Interleukin 1 and interleukin antagonism* **Blood**. 1991; **77**: 1627-52
- 414.- Dinarello CA. *Interleukin-1 en The Cytokine Handbook* Editor: Thomson AW. London. Academic Press. 1992; pp. 47-82
- 415.- Arend WP. *Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist* **Seminars in Arthritis & Rheumatism** 2001; **30** (5 suppl2): 1-6
- 416.- Rothwell NJ., Luheshi GN. *Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target* **Trends in Neuroscience** 2000; **23**: 618-625
- 417.- Apte RN., Voronov E. *Interleukin-1_a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions* **Cancer Biology** 2002; **12**: 277-290
- 418.- Morgan DA., Ruscetti FW., Gallo R. *Selective in vitro growth of lymphocytes from normal human bone marrow* **Science** 1976; **193**: 1007-8
- 419.- Taniguchi T., Minami Y. *The IL-2/IL-2 Receptor system: A current overview* **Cell** 1993; **73**: 5-8
- 420.- Paul WE., Seder RA. *Lymphocyte responses and cytokines* **Cell** 1994; **76**: 241-51

- 421.- Fehniger TA., Cooper MA., Caligiuri MA. *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer* **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2002; 13: 169-183
- 422.- Nelson BH. *Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance* **Current Direction in Autoimmunity** 2002; 5: 92-112
- 423.- Granucci F., Zanoni I., Feau S., Ricciardi-Castagnoli P. *Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity* **EMBO Journal** 2003; 22 (11): 2546-51
- 424.- Atkins MB. *Interleukin-2: clinical applications* **Seminars in Oncology** 2002; 29 (3 Suppl 7): 12-7
- 425.- Mosmann TR., Sad S. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2, and more* **Immunology Today** 1996; 17: 138-146
- 426.- Gessner A., Rollinghoff M. *Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes* **Immunobiology** 2000; 201 (3-4): 285-307
- 427.- Finney M., Guy GR., Michell RH. *Interleukin 4 activates human B lymphocytes via transient inositol lipid hydrolysis and delayed cyclic adenosine monophosphatase generation* **European Journal of Immunology** 1990; 20: 151-6
- 428.- Coffman R., Leberman D., Rothman P. *Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching* **Advance in Immunology** 1993; 54: 229-270
- 429.- Pawankar R., Okuda M., Yssel H., Okumura K. Ra C. *Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE* **Journal Clinical Investigation** 1997; 99: 1492-1499
- 430.- McKenzie ANJ. *Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13* **Pharmacology & Therapeutics** 2000; 88: 143-151
- 431.- Steinke JW., Borish L. *Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists* **Respiratory Research** 2001; 2: 66-70
- 432.- Martin R. *Interleukin 4 treatment of psoriasis: are pleiotropic cytokines suitable therapies for autoimmune diseases?* **Trends in Pharmacological Sciences** 2003; 24 (12): 613-616
- 433.- Horn F., Henze C., Heidrich K. *Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function* **Immunobiology** 2000; 202 (2): 151-167
- 434.- Choy E. *Clinical experience with inhibition of interleukin-6* **Rheumatic Disease Clinics of North American** 2004; 30 (2): 405-415 viii
- 435.- Rose-John. *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors* **Acta Biochimica Polonica** 2003; 50 (3): 603-611
- 436.- Jones SA., Horiuchi S., Topley N., Yamamoto N., Fuller GM. *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease* **FASEB Journal** 2001; 15: 43-58
- 437.- Moore KW., de Waal Malefyt R., Coffman RL., O'Garra A. *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor* **Annual Review of Immunology** 2001; 19: 683-765
- 438.- Mosmann TR., Moore KW. *The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses* **Immunology Today** 1991; 12: 49-53
- 439.- Fiorentino DF., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann TR., Howard M. *IL10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells* **Journal of Immunology** 1991; 146: 3444-51
- 440.- Pestka S., Krause CD., Devanand S., Walter MR., Shi Y., Fisher PB. *Interleukin-10 and related cytokines and receptors* **Annual Review of Immunology** 2004; 22: 929-979
- 441.- Haddad JJ., Saadé NE., Safieh-Garabedian B. *Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory actino of this cytokine?* **Cellular Signalling** 2003; 15: 255-267
- 442.- Haddad JJ., Fahlman CS. *Redox- and oxidant-mediated regulation of interleukine-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine?* **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2002; 297: 163-176
- 443.- Akdis CA., Blazer K. *Mechanisms of interleukine-10-mediated inmune supresión* **Immunoly** 2001; 103: 131-136

- 444.- Conti P., Kempuraj D., Kandere K., Di Gioacchino M., Barbacane RC., Castellani ML., Felaco M., Boucher W., Letourneau R., Theoharides TC. *IL10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always* **Immunology Letters** 2003; 86: 123-129
- 445.- Asadullah K., Sterry W., Volk AH. *Interleukine-10 therapy-Review of a new approach* **Pharmacological Reviews** 2003; 55: 241-269
- 446.- Bellinghausen I., Knop J., Saloga J. *The role of interleukin 10 in the regulation of allergic responses* **International Archives of Allergy and Immunology** 2001; 126 (2): 97-101
- 447.- Yamauchi J., Shibuya K., Sunamura M., Shimamura H., Matoi F., Takeda., Matsuno S. *Cytokine modulation in acute pancreatitis* **Journal of Hepatobiliary and Pancreatology Surgery** 2001; 8: 195-203
- 448.- Ceutler B., Cerami A. *Cachetin: more than a tumor necrosis factor* **New England Journal of Medicine** 1987; 316: 379-85
- 449.- Wallach D., Varfolomeev EE., Malinin NL., Goltsev YV., Kovalenko AV., Boldin MP. *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms* **Annual Reviews in Immunology** 1999; 17: 331-367
- 450.- Gupta S. *A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling* **Journal of Clinical Immunology** 2002; 22 (4): 185-194
- 451.- Alexander-Miller MA., Derby MA., Sarin A., Henkart PA., Berzofsky JA. *Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bcl-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes* **Journal of Experimental Medicine** 1998; 188: 1391-1399
- 452.- Pimentel-Muinós FX., Seed B. *Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation* **Immunity** 1999; 11: 783-793
- 453.- Eigler A., Sinha B., Hartman G., Endres S. *Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine* **Immunology Today** 1997; 18: 487-492
- 454.- Palladino MA., Bahjat FR., Theodorakis EA., Moldawer LL. *Anti-TNF-alpha therapies: the next generation* **Nature Review Drug Discovery** 2003; 2 (9): 736-746
- 455.- Budd R. *Activation-induced cell death* **Current Opinion in Immunology** 2001; 13: 356-362
- 456.- Toussiro E., Wendling D. *The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an overview* **Expert Opinion in Pharmacotherapy** 2004; 5 (3): 581-594
- 457.- Andreakos ET., Foxwell BM., Brennan FM., Maini RN., Feldmann M. *Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future* **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2002; 13: 299-313
- 458.- Chesler DA., Reiss CS. *The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system* **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2002; 13: 441-454
- 459.- Koopman JO., Hämmerling GJ., Momburg F. *Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules* **Current Opinion in Immunology** 1997; 9: 80-8
- 460.- Boss JM. *Regulation of transcription of MHC class II genes* **Current Opinion in Immunology** 1997; 9: 107-13
- 461.- Hidalgo LG., Halloran PF. *Role of IFN-gamma in allograft rejection* **Critica Review in Immunology** 2002; 22 (4): 317-349
- 462.- Janeway.CA., Travers.P., Walport M., Capra D. *El Sistema del complemento en la inmunidad humoral en Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 4ª Ed. Barcelona (España) Masson S.A. 2000; 9-2: pp. 339-358*

Introducción: P.A. Inmunología

- 463.- Pezzilli R., Billi P., Beltrandi E., Maldini M., Mancini R., Morselli Labate AM., Miglioli M. *Circulating lymphocyte subsets in human acute pancreatitis* **Pancreas** 1995; 11(1): 95-100
- 464.- Takeyama Y., Takase K., Ueda T., Hori Y., Goshima M., Kuroda Y. *Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death* **J Gastrointestinal Surgery** 2000; 4(4): 379-87
- 465.- Pezzilli R., Maldini M., Morselli-Labate AM., Barakat B., Romboli E., Beltrandi E., Migliori M., Tomassetti P., Corinaldesi R. *Early activation of peripheral lymphocytes in human acute pancreatitis* **Journal of Clinical Gastroenterology** 2003; 36: 360-3

- 466.- de Dios I., Pérez M., de la Mano A., Sevillano S., Orfao A., Ramudo L., Manso MA. *Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats* **Cytokine** 2002; 20: 295-303
- 467.- Demols A., Le Moine O., Desalle F., Quertinmont E., Van Laethem JL., Devière J. *CD4+ T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice* **Gastroenterology** 2000; 118: 582-590.
- 468.- Curley PJ., McMahon MJ., Lancaster F., Banks RE., Barclay GR., Shefta J., Boylsto AW., Whicher JT. *Reduction in circulating levels of CD4-positive lymphocytes in acute pancreatitis: relationship to endotoxin, interleukine 6 and disease severity* **British Journal of Surgery** 1993; 80: 1312-5
- 469.- Uehara S., Gothoh K., Handa H., Tomita H., Tomita Y. *Innate function in patients with acute pancreatitis* *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18: 363-70
- 470.- Pezzilli R., Billi P., Gullo L., Beltrandi E., Maldini M., Mancini R., Incorvaia L., Miglioli M. *Behavior of serum soluble interleukine-2 receptor, soluble CD8 and soluble CD4 in the early phases of acute pancreatitis* **Digestion** 1994; 55: 268-73
- 471.- Bhatnagar A., Wig JD., Majumdar S. *Expression of activation, adhesion molecules and intracellular cytokine in acute pancreatitis* **Immunology Letter** 2001; 77(3): 133-41
- 472.- Sweeney KJ., Kell MR., Coates C., Murphy T., Reynolds JV. *Serum antigen(s) drive the proinflammatory T cell response in acute pancreatitis* **British J Surgery** 2003; 90(3): 313-318
- 473.- Gotzinger P., Sautner T., Spitler A., Barlan M., Wamser P., Roth E., Jakezs R., Fugger R. *Severe acute pancreatitis causes alterations in HLA-DR and CD14 expression on peripheral blood monocytes independently of surgical treatment* **European Journal of Surgery** 2000; 166: 628-32
- 474.- Kylanpaa-Back ML., Takala A., Kemppainen E., Puolakkainen P., Kautiainen H., Jansson SE., Haapiainen R., Repo H. *Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to acute pancreatitis* **Scandinavian J Gastroenterology** 2001; 36(10): 1100-7
- 475.- Yu WK., Li WQ, Li N., Li JS *Mononuclearhistocompatibility leukocyte antigen-DR expresión in the early phase of acute pancreatitis* **Pancreatology** 2004; 4: 233-243
- 476.- Richter A., Nebe T., Wendl K., Schuster K., Klaebisch G., Quintel M., Lorenz., Trede M. *HLA-DR expression in acute pancreatitis* **European Journal Surgery** 1999; 165(10): 947-51
- 477.- Satoh A., Miura T., Satoh K., Masamune A., Yamagiwa T., Sakai Y., Shibuya K., Takeda K., Kaku M., Shimosegawa T. *Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis* **Pancreas** 2002 25(3): 245-50
- 478.- Mentula P., Kylanpaa-Back ML., Takala A., Jansson SE., Kautiainen H., Kemppainen E., Puolakkainen P., Haapiainen R., Repo H *Decreased HLA (human leukocyte antigen)-DR expression on peripheral blood monocytes predicts the development of organ failure in patients with acute pancreatitis* **Clinical Science (London)** 2003; 105: 409-17
- 479.- Werner J., Z'graggen K., Fernández-del Castillo C., Lewandrowski KB., Compton CC., Warshaw AL. *Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1* **Annals of Surgery** 1999; 226: 834-842
- 480.- Frossard JL., Saluja A., Bhagat L., Lee HS., Bhatia M., Hofbauer B., Steer ML. *The Role of intracellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury* **Gastroenterology** 1999; 116: 694-701
- 481.- Callicutt CS., Sabek O., Fukatsu K., Lundberg AH., Gaber L., Wilcox H., Kotb M., Gaber AO. *Diminished lung injury with vascular adhesion molecule-1 blockade in choline-deficient ethionine diet-induced pancreatitis* **Surgery** 2003;133: 186-196
- 482.- Hartwig W., Werner J., Warshaw AL., Antoniu B., Castillo CF., Gebhard MM., Uhl W., Buchler MW. *Membrane-bound ICAM-1 is upregulated by trypsin and contributes to leukocyte migration in acute pancreatitis* **American Journal of Physiology & Gastrointestinal Liver Physiology** 2004; 287 (6): G1194-9
- 483.- Hać S., Dobosz M., Kaczor J., Rzepko R. *Influence of molecule CD 11b blockade on the course of acute ceruleine pancreatitis in rats* **Experimental and Molecular Pathology** 2004; 77: 57-65
- 484.- Takala A. Jousela I. Takkunen O., Kautiainen H., Jansson SE., Orpana A., Karonen SL., Repo H. *A prospective study of inflammation markers in patients at risk of indirect acute lung injury* **Shock** 2002

- 485.- Mann DV., Kalu P., Foulds S., Edwards R., Glazer G. *Neutrophil activation and hyperamylasaemia after endoscopic retrograde cholangio-pancreatography: potential role for the leukocyte in the pathogenesis of acute pancreatitis* **Endoscopy** 2001; 33: 448-53
- 486.- Sunamura M., Yamauchi J., Shibuya K., Chen HM., Ding L., Takeda K., Kobari M., Matsumo D. *Pancreatic microcirculation in acute pancreatitis* **Journal of Hepatobiliary and Pancreatology Surgery** 1998; 5: 62-8
- 487.- Menger MD., Plusczyk T., Vollmar B. *Microcirculatory derangements in acute pancreatitis* **Journal of Hepatobiliary and Pancreatology Surgery** 2001; 8: 187-194
- 488.- Nakae H., Endo S., Sato N., Wakabayashi G., Inada K., Sato S. *Involvement of soluble adhesion molecules in acute pancreatitis* **European Surgery Research** 2001; 3: 377-382
- 489.- Murdoch C., Finn A. *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases* **Blood** 2000; 95: 3032-43
- 490.- Grady T., Liang P., Ernst SA., Logsdon CD. *Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis* **Gastroenterology** 1997; 113: 1966-75.
- 491.- Osman MO., Gesser B., Mortensen JT., Matshushima K., Jensen SL., Larsen CG. *Profiles of pro-inflammatory cytokines in the serum of rabbits after experimentally induced acute pancreatitis* **Cytokine** 2002; 17: 53-59
- 492.- Brady M., Bhatia M., Christmas S., Boyd MT., Neoptolemos JP., Slavin J. *Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis* **Pancreas** 2002; 25: 260-269
- 493.- Pastor CM., Rubbia-Brandt L., Hadengue A., Jordan M., Morel P., Frossard JL. *Role of macrophage inflammatory peptide-2 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury* **Laboratory Investigation** 2003; 83: 471-478
- 494.- Yang BM., Demaine AG., Kingsnorth A. *Chemokines MCP-1 and RANTES in isolated rat pancreatic acinar cells treated with CCK and ethanol in vitro* **Pancreas** 2000; 21: 22-31
- 495.- Bhatia M., Brady M., Kang YK., Costello E., Newton DJ., Christmas SE., Neoptolemos JP., Slavin J. *MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation* **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology** 2002; 282: G77-85
- 496.- Sakai Y., Masamune A., Satoh A., Nishihira J., Yamagiwa T., Shimosegawa T. *Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis* **Gastroenterology** 2003; 124: 725-736
- 497.- Bhatia M., Brady M., Zagorski J., Christmas SE., Campbell F., Neoptolemos JP., Slavin J. *Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury* **Gut** 2000; 47: 838-844
- 498.- Bhatia M., Proudfoot AE., Wells TN., Christmas S., Neoptolemos JP., Slavin J. *Treatment with Met-RANTES reduces lung injury in caerulein-induced pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2003; 90: 698-704
- 499.- Rau B., Baumgart K., Kruger CM., Schilling M., Beger HG. *CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications* **Intensive Care Medicine** 2003; 29: 622-9
- 500.- Shokuhi S., Bhatia M., Christmas S., Sutton R., Neoptolemos JP., Slavin J. *Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 2002; 89: 566-572
- 501.- Andoh A., Takaya H., Saotome T., Shimada M., Hata K., Araki Y., Nakamura F., Shintani Y., Fujiyama Y., Bamba T. *Cytokine regulation of chemokine (IL8-, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts* **Gastroenterology** 2000; 119: 211-219
- 502.- Goecke H., Forssmann U., Uguccioni M., Friess H., Conejo-García JR., Zimmermann A., Baggolini M., Büchler MW. *Macrophages infiltrating the tissue in chronic pancreatitis express the chemokine receptor CCR5* **Surgery** 2000; 128(5): 806-14.
- 503.- Saurer L., Reber P., Schaffner T., Büchler MW., Buri C., Kappeler A., Walz A., Friess H., Mueller C. *Differential expression of chemokines in normal pancreas and chronic pancreatitis* **Gastroenterology** 2000; 118: 356-367

- 504.- Gando S., Nishihira J., Kobayashi S., Morimoto Y., Nanzaki S., Kemmotsu O. *Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of systemic inflammatory response syndrome* **Intensive Care Medicine** 2001; 27: 1187-1193
- 505.- Pedersen N., Larsen S., Seidelin JB., Nielsen OH. *Alcohol modulates circulating levels of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 in chronic pancreatitis* **Scandinavian Journal of Gastroenterology** 2004; 39: 277-282
- 506.- Bhatia M., Mochhala S. *Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome* **Journal of Pathology** 2004; 202: 145-156
- 507.- Gerard C., Frossard JL., Bhatia M., Gerard NP., Lu B., Steer M. *Targeted disruption of the β -chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury* **Journal of Clinical Investigation** 1997; 100: 2022-2027.
- 508.- Steer M. *Relationship between pancreatitis and lung diseases* **Respiration Physiology** 2001; 128: 13-16
- 509.- Bhatia M., Ramnath RD., Chevali L., Guglielmotti A. *Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis* **American Journal of Physiology & Gastrointestinal Liver Physiology** 2005; 288 (6): G1259-65
- 510.- Makhija R., Kingsnorth AN. *Cytokine storm in acute pancreatitis* **Journal of Hepatobiliary & Pancreatology Surgery** 2002; 9: 401-410
- 511.- Yasuda H., Kataoka K., Ichimura H., Mitsuyoshi M., Kita M., Imanishi J. *Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice* **Journal of Interferon Cytokine Research** 1999; 19: 637-644
- 512.- Hense S., Sparmann G., Weber H., Liebe S., Emmrich J. *Immunologic characterization of acute pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC)* **Pancreas** 2003; 27: E6-E12
- 513.- Bentrem DJ., Joehl RJ. *Pancreas: healing response in critical illness* **Critical Care Medicine** 2003; 31(8 Suppl): S582-S589
- 514.- Leindler L., Morschl E., Laszlo F., Mandi Y., Takacs T., Jarmai K., Farkas G. *Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats* **Pancreas** 2004; 29: 157-161
- 515.- Vaccaro MI., Calvo EL., Suburo A., Sordelli DO., Lanosa G., Iovanna JL. *Lipopolysaccharide directly affects pancreatic acinar cells. Implications on acute pancreatitis pathophysiology* **Digestive Diseases and Sciences** 2000; 45: 915-926
- 516.- Ramudo L., Manso MA., De Dios I. *Biliary pancreatitis-associated ascitic fluid activates the production of tumor necrosis factor- α in acinar cells* **Critical Care in Medicine** 2005; 33 (1): 143-8
- 517.- Ramudo L., Manso MA., Sevillano S., de Dios I. *Kinetic study of TNF- α production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction* **Journal of Pathology** 2005; 206 (1): 9-16
- 518.- Mikami Y., Takeda K., Shibuya K., Qiu-Feng H., Egawa S., Sunamura M., Matsuno S. *Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness* **Surgery** 2002; 132: 86-92
- 519.- Cuzzocrea S., Mazzon E., Dugo L., Centorrino T., Ciccolo A., McDonald MC., De Sarro A., Caputi AP., Thiemeermann C. *Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice* **Cytokine** 2002; 18: 274-285
- 520.- Alsfasser G., Antoniu B., Thayer SP., Warshaw AL., Fernandez-Del Castillo C. *Degradation and inactivation of plasma tumor necrosis factor- α by pancreatic proteases in experimental acute pancreatitis* **Pancreatology** 2005; 5 (1): 37-43
- 521.- Curley P., Nestor M., Collins K., Saporoschetz I., Mendez M, Mannick JA., Rodrick ML. *Decreased interleukin-2 production in murine acute pancreatitis: potential for immunomodulation* **Gastroenterology** 1996; 110: 583-88.
- 522.- Chen CC., Wang SS., Lee FY., Chang FY., Lee SD. *Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis* **American Journal of Gastroenterology** 1999; 94(1): 213-18
- 523.- Hynninen M., Valtonen M., Marllanen H., Vaara M., Kuusela P., Jousela I., Piilonen A., Takkunen O. *Intramuscular pH and endotoxin and cytokine release in severe acute pancreatitis* **Shock** 2000; 13: 79-82

- 524.- Hirota M., Nozawa F., Okabe A., Shibata M., Beppu T., Shimada S., Egami H., Yamaguchi Y., Ikei S., Okajima K., Okamoto K., Ogawa M. *Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis* **Pancreas** 2000; 21(2): 141-6
- 525.- Mayer J., Rau B., Gansauge F., Berger HG. *Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications* **Gut** 2000; 47: 546-52
- 526.- Wereszczynska-Siemiatkowska U., Dabrowski A., Siemiatkowski A., Mroczko B., Lassewicz W., Gabryelewicz A. *Serum profiles of E-selectin, interleukin-10, and interleukin-6 and oxidative stress parameters in patients with acute pancreatitis and nonpancreatic acute abdominal pain* **Pancreas** 2003; 26: 144-152
- 527.- McKay CJ., Gallagher G., Brooks B., Imrie CW., Baxter JN. *Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis* **British Journal of Surgery** 1996; 83: 919-23
- 528.- Pooran N., Indaram A., Singh P., Bank S. *Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early reliable predictors of severe acute pancreatitis* **Journal of Clinical Gastroenterology** 2003; 37: 263-266
- 529.- Berney T., Gasche Y., Robert J., Jenny A., Mensi N., Grau G., Vermeulen B., Morel P. *Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis* **Pancreas** 1999; 18(4): 371-7.
- 530.- Oezcuemez-Porsch M., Kunz D., Hardt PD., Fadgyas T., Kress O., Schulz HU., Schnell-Kretschmer H., Temme H., Westphal S., Luley C., Kloer HU. *Diagnostic relevance of interleukin pattern, acute-phase proteins, and procalcitonin in early phase of post-ERCP pancreatitis* **Digestive Diseases and Science** 1998; 43: 1763-1769
- 531.- Messmann H., Vogt W., Falk W., Vogl D., Zirngibl H., Leser HG., Schölmerich J. *Interleukins and their antagonists but not TNF and its receptors are released in post-ERCP pancreatitis* **European Journal of Gastroenterology Hepatology** 1998; 10: 611-617
- 532.- Wozniak B., Wisniewska-Jarosinska M., Drzewoski J. *Evaluation of selected parameters of the inflammatory response to endoscopic retrograde cholangio-pancreatography* **Pancreas** 2001; 23: 349-355
- 533.- Chen CC., Wang SS., Lu RH., Lu CC., Chang FY., Lee SD. *Early changes of serum proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after endoscopic retrograde cholangiopancreatography* **Pancreas** 2003; 26: 375-380
- 534.- Pezzilli R., Morselli-Labate AM., Miniero R., Barakat B., Fiocchi M., Cappelletti O. *Simultaneous serum assays of lipase and interleukin-6 for early diagnosis and prognosis of acute pancreatitis* **Clinical Chemistry** 1999; 45: 1762-1767
- 535.- Kurdowska A., Noble JM., Grant IS., Robertson CR., Haslett C., Donnelly SC. *Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome* **Critical Care Medicine** 2002; 30: 2335-2337
- 536.- Bhatnagar A., Wig J., Vaiphei K., Majumdar S. *Intracellular cytokines in cells of necrotic tissue from patients with acute pancreatitis* **European Journal of Surgery** 2001; 167: 510-517
- 537.- Denham W., Norman J. *The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis* **Surgery Clinical North American** 1999; 79: 767-781
- 538.- Rongione AF., Kusske AM., Reber HA., Ashley SW., McFadden DW. *Interleukin-10 reduces circulating levels of serum cytokines in experimental pancreatitis* **Journal of Gastroenterology Surgery** 1997; 1: 159-66
- 539.- Zou WG., Wang DS., Lang MF., Jin DY., Xu DH., Zheng ZC., Wu ZH., Liu XY. *Human interleukin 10 gene therapy decreases the severity and mortality of lethal pancreatitis in rats* **Journal of Surgical Research** 2002; 103: 121-126
- 540.- Oruc N., Ozutemiz AO., Yukselen V., Nart D., Celik HA., Yuce G., Batur Y. *Infliximab: a new therapeutic agent in acute pancreatitis?* **Pancreas** 2004; 28 (1): e1-8
- 541.- Tuo H., Sugiyama M., Nakashima M., Abe N., Atomi Y. *Effects of granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils and inflammatory cytokines in the early stage of severe acute pancreatitis in rats* **Journal of Gastroenterology** 2005; 40 (2): 186-191
- 542.- Dumot JA., Conwell DL., Zuccaro G., Vargo JJ., Shay SS., Easley KA., Ponsky JL. *A randomized, double blind study of interleukin 10 for the prevention of ERCP-induced pancreatitis* **The American Journal of Gastroenterology** 2001; 96: 2098-2102

- 543.- Bhatia M. *Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis* **American J Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology** 2004; 286: G189-G196
- 544.- Jeyarajah DR., Kielar M., Gokaslan ST., Lindberg G., Lu Cy. *Fas deficiency exacerbates cerulein-induced pancreatitis* **Journal of Investigation Surgery** 2003; 16: 325-333
- 545.- Bhatia M., Wallig MA., Hofbauer B., Lee HS., Frossard JL. *Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis* **Biochemical and Biophysical Research Communications** 1998; 246(2): 476-83
- 546.- Frossard JL., Rubbia-Brandt L., Walling MA., Benatham M., Ott T., Morel P., Hadengue A., Suter S., Willcke K., Chanson M. *Severe acute pancreatitis and reduced acinar cell apoptosis in the exocrine pancreas of mice deficient for the Cx32 gen* **Gastroenterology** 2003; 124: 481-493
- 547.- Takeyama Y. *Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis* **Journal of Gastroenterology** 2005; 40 (1): 1-10
- 548.- Gallagher SF., Peng Y., Haines K., Baksh K., Burnette E., Yang J., Murr MM. *Fas/FasL play a central role in pancreatitis-induced hepatocyte apoptosis* **Journal of Gastrointestinal Surgery** 2005; 9: 947-475
- 549.- Salomone T., Tosi P., Raiti C., Guariento A., Tomassetti P., Migliori M., Saieva C., Romboli M., Gullo L. *Apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells as a self-limitation process in human acute pancreatitis* **Pancreatology** 2002; 2(3): 204-10
- 550.- Andican G., Gelisgen R., Unal E., Tortum OB., Dervisoglu S., Karahasanoglu T., Burçak G. *Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis* **World Journal of Gastroenterology** 2005; 11 (15): 2340-2345
- 551.- Benz S., Obermaier R., Wiessner R., Breitenbuch PV., Burska D., Weber H., Schnabel R., Mayer J., Pfeffer F., Nizze H., Hopt UT. *Effect of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the pancreas* **Journal of Surgery Research** 2002; 106: 46-53
- 552.- Takacs T., Czako L., Morschl E., Laszlo F., Tizslavicz L., Rakonczay Z Jr., Lonovics J. *The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis* **Pancreas** 2002; 25: 277-282
- 553.- Sandstrom P., Brooke-Smith ME., Thomas AC., Grivell MB., Saccone GT., Toouli J., Svanvik J. *Highly selective inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental acute pancreatitis* **Pancreas** 2005; 30 (1): e10-5
- 554.- Cuzzocrea S., Masón E., Dugo L., Serraino I., Centorrino T., Ciccolo A., Van de Loo FAJ., Britti D., Caputi AP., Thiemermann C. *Inducible nitric oxide synthase-deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein* **Shock** 2002; 17: 416-422
- 555.- Sanchez-Bernal C., Garcia-Morales OH., Dominguez C., Martin-Gallan P., Calvo JJ., Ferreira L., Perez-Gonzalez N. *Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis* **Pancreas** 2004; 28: e9-e15
- 556.- DiMugno MJ., Williams JA., Hao Y., Ernst SA., Owyang C. *Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice* **American J Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology** 2004; 287: G80-G87
- 557.- Rahman SH., Ammori BJ., Larvin M., McMahon MJ. *Increased nitric oxide excretion in patients with severe acute pancreatitis: evidence of an endotoxin mediated inflammatory response?* **Gut** 2003; 52: 270-274
- 558.- Mettu SR., DevWig J., Khullar M., Singh G., Gupta R. *Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis* **Pancreatology** 2003; 3: 506-514

Materiales y Métodos

- 559.- Prieto A., Díaz D., Barcenilla H., García-Suárez J., Reyes E., Monserrat J., San Antonio E., Melero D., de la Hera A., Orfao A., Álvarez-Mon M. *Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures* **Cytometry** 2002; 48: 185-193

Discusión

- 560.- Frossard JL., Kwak B., Chansson M., Morel P., Hadengue A., Mach F. *CD40 ligand-deficient mice are protected against cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury* **Gastroenterology** 2001; 121: 184-94

- 561.- Gabriel H., Schwarz L., Steffens G., Kindermann W. *Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities* **International Journal of Sports Medicine** 1992; 13(5): 359-366

562.- Gabriel H., Schwarz L., Born P., Kindermann W. *Differential mobilization of leukocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise* **European Journal Appl Physiol Occup Physiol** 1992; **65(6): 529-534**

563.- Scharhag J., Meyer T., Gabriel HH., Schlick B., Faude O., Kindermann W. *Does prolonged cycling of moderate intensity affect immune cell function?* **British Journal of Sports Medicine** 2005; **39 839. 171-177**

564.- Glaser F., Sannwald GA., Buhr HJ., Kuntz C., Mayer H., Klee F., Herfarth C. *General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy* **Annals of Surgery** 1995; **221(4): 372-380**

565.- Abe R., Shimosewaga T., Kimura K., Abe T., Kashimura J., Koizumi M., Toyota T. *The role of endogenous glucocorticoids in rat experimental models of acute pancreatitis* **Gastroenterology** 1995; **109(39): 933-943**

566.- Prieto A., Diaz D., Barcenilla H., Castrillo C., Monserrat J., Garcia Merino A., Álvarez-Mon M. *Increased spontaneous ex vivo apoptosis and subset alterations in peripheral blood T cells from patients with multiple sclerosis* **Journal of Clinical Immunology** 2006 (aceptado para publicación)

ANEXO I

SUMMARY

Background: acute pancreatitis (AP) is an acute inflammatory process of the pancreas, with variable involvement of peripancreatic tissues and remote organ systems depend on severity of disease. A range of morphological findings exists, from interstitial oedema in mild disease (APM) to confluent areas of necrosis and haemorrhage in severe disease (APS). Cause inflammatory character, the involvement of immune system in the pathogenesis of AP constitutes an important study area. The pancreatic autodigestion cause by inappropriate activation of the proteolytic enzyme trypsin provokes an inflammatory cascade mediated by cytokines, complement factors and migration of activated leukocytes (macrophage, lymphocyte and neutrophil). Previous studies on experimental models and patients with AP reveal a strong leukocytosis and marked lymphopenia, higher in APS than APM, in peripheral blood. Also, an increase of inflammatory cytokines, some of these are implicated in disease progression (TNF α , IL6, IL8), chemokines, adhesion molecules (CD11b, CD62L), and decrease of HLA-DR expression in macrophage (another predictive marker) have been found. Recently, the involvement of apoptosis in pancreatic injury and lymphopenia has been proposed. Gravel prognostic scoring systems, with clinical, immunological, laboratory, and radiological criteria, have been developed to prediction of the severity of an attack at the time of admission, but APACHE II and Ranson Criteria, Balthazar Score, and C-reactive protein are more used. The **aim** of this study is to investigate the functional state of peripheral mononuclear cells from mild and severe acute pancreatitis patients, and to determinate their clinical significance.

Material and methods: heparinised blood samples from twenty nine APM and seventeen APS patients according to inclusion criteria based Atlanta classification were obtained at the time of admission, after 48h and 5 days. Sixty blood samples from healthy controls with age and sex matched were obtained too. The specific objectives of study are to evaluate in different subsets of peripheral lymphocytes and monocytes from these patients: a) the expression of surface antigens associated to cell activation, costimulation, tissular migration by lymphocytes (T, B and NK cells), b) the intracellular production of inflammatory cytokines and apoptosis by T lymphocytes; c) the expression of activation and tissular migration molecules, intracellular production of pro-inflammatory cytokines, phagocytosis and nitric oxide production by monocytes. Antigen surface expression and intracellular cytokine production were determined by immunostaining with monoclonal antibodies; apoptosis, phagocytosis and nitric oxide production levels were measured by fluorescent products; four colours flow cytometry quantitative were used.

Results: Significant differences in the number of cells and distribution of lymphocyte subsets, including lymphopenia, decrease of ratio CD4/CD8 and increment of effector/memory

lymphocytes, were observed between patients and healthy controls at the time of admission. The expression levels of activation markers (CD25, CD69, CD71, HLA-DR, CD56, CD95), costimulatory molecules (CD152, CD154) and adhesion molecules (CD11a^{high}, CD11b) in T cells were significantly higher in both patients groups, APM and APS, than healthy controls. Also, an increment of chemokine receptors (CkRs) expression (CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3, CXCR4) were found in all lymphocyte subsets from these patients. Because characteristic lymphopenia of patients with AP, the absolute number of cells was lower in most analyzed subsets compared to controls except, an augment of CD4+CD95+ and CD8+CD95+ lymphocytes and no differences in number of lymphocytes that express CkRs. These immunological alterations were usually normalized with inflammatory episode remission. The functional studies about intracellular cytokine production and apoptosis in T cells showed a greater cytokines production (IL2, IFN γ , TNF α) and spontaneous apoptosis in patients respect to healthy controls, with no significant changes during clinical course. IL4, IL6 and IL10 expression levels and spontaneous apoptosis were higher and lower respectively than APS. When we analyzed monocyary population, an increase of activation markers (CD80, CD40, CD62L) and CkRs, and decrease of intracellular cytokine production (IL1 β , IL6, TNF α), phagocytosis and nitric oxide (NO) production were found in patients respect to healthy controls, and values were significantly lower in patients with APS compared to APM except CkRs and CD62L expression. Also, according previous studies, a strongly decreased HLA-DR expression were observed in patients with APS respect to patients with APM and healthy controls.

Conclusions: Our results have demonstrated that there is an intense alteration of immune system in patients with acute pancreatitis since early phases of disease. This anomalous immune response affects to principal cellular compartments, including T and B lymphocytes and monocytes, and is manifested by a prevalence of activated subsets with increment of adhesion and recirculation molecules, a predominant proinflammatory and Th2 pattern with associated decrease anti-inflammatory ability, and a striking impaired cytokine production, phagocytosis and oxidative capacity in monocytes. On the other hand, there are clear differences in system immune behaviour related to severity of disease in patients with AP. Despite the mechanisms which trigger these alterations are not clearly defined, an anomalous activation of immune system have been demonstrated and, therefore, we could reasonably suggest its involvement in the development of systemic and local tissular injury associated to AP.