

## Estudio de los valores del factor de necrosis tumoral alfa tisular pancreático en la pancreatitis aguda experimental

A. López\*, J.C. Rueda\*\*, J.I. Landa\*\*\* y J.L. Balibrea\*\*\*\*

\*Médico adjunto de Cirugía. Hospital Montecelo. Pontevedra. \*\*Profesor de Cirugía. Universidad de Vigo.

\*\*\*Profesor de Cirugía. Universidad Complutense de Madrid. \*\*\*\*Catedrático de Cirugía. Universidad Complutense de Madrid.

### Resumen

**Introducción.** En la actualidad, la confirmación de la infección de la necrosis pancreática durante la pancreatitis aguda (PA) en el ser humano parece ser el único aspecto que hace preferible la indicación quirúrgica en estos pacientes. El objetivo del presente estudio es evaluar los valores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tisular pancreático como posible parámetro indicador de formas graves de pancreatitis aguda en la rata Wistar.

**Material y métodos.** Se utilizan 45 ratas Wistar para el estudio. El grupo control (C) está constituido por 4 ratas. Se induce la PA experimental en 41 ratas Wistar mediante la inyección retrógrada ductal de taurocolato sódico al 5%. Se estiman los valores del TNF- $\alpha$  tisular pancreático en la fracción citosoluble del homogeneizado pancreático obtenido tanto en los controles como en las ratas en las que se induce la PA, distribuidas en grupos según el intervalo transcurrido hasta su sacrificio: 1, 3, 12 y 24 h (grupos 1, 3, 12 y 24).

**Resultados.** Los valores del TNF- $\alpha$  tisular pancreático son detectables en el páncreas de la rata sana ( $43,3 \pm 7,7$  mg/ml). Con la inducción de la enfermedad se elevan los valores del TNF- $\alpha$  con respecto a los controles en los diversos grupos evolutivos (G1 = 101; G3 = 119,3; G12 = 144,2; G24 = 133,9). Existen diferencias estadísticamente significativas de los diversos grupos evolutivos con respecto al grupo control. El test de la t de Student fue significativo para  $p < 0,05$ .

**Conclusiones.** Utilizando un modelo experimental de necrosis pancreática de alta agresividad y letalidad demostrada, podemos afirmar que la cuantificación del TNF tisular pancreático es posible y sus valores se elevan en el transcurso de la PA necrohemorrágica experimental. La determinación del TNF- $\alpha$  en las ratas sanas con valores significativamente inferiores a los obtenidos durante la evolución de las ratas afectadas de PA permite incorporar la determinación de dicho parámetro bioquímico tisular a los factores de gravedad de la enfermedad.

**Palabras clave:** Pancreatitis aguda experimental. Ratas. Factor de necrosis tumoral.

(Cir Esp 2001; 69: 539-541)

### STUDY OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA LEVELS IN PANCREATIC TISSUE IN ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS

**Introduction.** Currently, confirmation of infection of pancreatic necrosis during acute pancreatitis in humans seems to be the only aspect that makes surgical indication in these patients preferable. The aim of the present study was to evaluate levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in pancreatic tissue as a possible indicator of severe forms of acute pancreatitis in Wistar rats.

**Material and methods.** Forty-five Wistar rats were used in the study. The control group was composed by four rats. Acute experimental pancreatitis was induced in 41 Wistar rats by retrograde ductal injection of sodium taurocholate 5%. Values of TNF-alpha in pancreatic tissue were estimated in the cytosolic fraction of pancreatic homogenate obtained both from controls and from rats in whom acute pancreatitis was induced, distributed in groups according to the interval until sacrifice at 1, 3, 12 and 24 hours (groups 1, 3, 12 and 24).

**Results.** Levels of TNF-alpha in pancreatic tissue were detectable in the pancreas of healthy rats ( $43,3 \pm 7,7$  mg/ml). Levels of TNF-alpha rose with induction of the disease compared with controls in the different experimental groups: group 1 = 101, group 3 = 119,3, group 12 = 144,2 and group 24 = 133,9. Statistically significant differences were found between the various experimental groups compared with the control group. Differences were considered significant at  $p < 0,05$  using Student's t-test.

**Conclusions.** Use of a highly aggressive and lethal experimental model of pancreatic necrosis demonstrates that TNF-alpha can be quantified in pancreatic tissue and that levels of this lymphokine are increased during the course of acute experimental necrohemorrhagic pancreatitis. TNF-alpha values in healthy rats were significantly lower than those found during the evolution of rats with acute pancreatitis, revealing that determination of this biochemical tissular parameter may be considered one of the factors indicating the severity of this disease.

**Key words:** Acute experimental pancreatitis. Rats. Tumor necrosis factor.

### Introducción

Desde 1993 se aceptan como pancreatitis agudas (PA) graves aquellas formas clínicas que presentan durante su evolución complicaciones locales o generales, como el fracaso multiorgánico, la sepsis o la muerte del paciente<sup>1</sup>.

Correspondencia: Dr. J.C. Rueda.  
Blanco Porto, 7, 1.<sup>o</sup>. 36001 Pontevedra.

Aceptado para su publicación en diciembre del 2000.

Los factores pronósticos más utilizados en la actualidad incluyen la clasificación APACHE II aplicada a la PA, la proteína C reactiva o la tomografía axial computarizada con la administración de contraste intravenoso (TC dinámica)<sup>2-4</sup>.

La estimación de los pacientes fallecidos por PA confirma que un tercio de las muertes se produce durante la primera semana en relación con un fallo multiorgánico, mientras que el resto lo hacen a partir de la segunda semana en relación con una sobreinfección bacteriana de la necrosis pancreática. Desde otro punto de vista, aunque sólo el 50% de los pacientes afectados de necrosis pancreática presentarán infección de la misma, se acepta que con la optimización del tratamiento la mortalidad de los casos infectados oscila entre el 10 y el 30%<sup>5</sup>.

En la clínica el diagnóstico de infección es básico, pues si bien hay criterios pronósticos de infección de notable especificidad, como son la interleucina 8 y la procalcitonina<sup>6</sup>, en la actualidad, antes de indicar una necrosectomía quirúrgica, intentamos la confirmación de la infección de la necrosis pancreática mediante punción por TC y tinción de Gram positiva.

Sin embargo, existen casos en los que, a pesar de estar el paciente en fase avanzada, la punción y la tinción de Gram no detectan la existencia de bacterias y el paciente presenta un deterioro clínico progresivo que hace dudar sobre la adopción de actitudes abstencionistas o quirúrgicas, sin un criterio claro que respalde ninguna de ellas.

El motivo del presente trabajo es valorar la posibilidad de determinar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tisular pancreático de forma experimental, con el fin de valorar su sensibilidad en la detección de las formas más graves de la enfermedad.

El ensayo terapéutico que se incluye pretende recoger básicamente las posibles variaciones en la proteína inflamatoria.

## Material y métodos

En el estudio se incluyeron 45 ratas hembra de cepa Wistar, con un peso de  $320 \pm 30$  g (Ico: WI[IOS AF/Han]). El estudio se efectuó de acuerdo con la normativa vigente sobre experimentación animal (RD 88/223d).

Los animales fueron habituados a su nuevo medio durante un período no inferior a 30 días en el estabulario de la unidad de cirugía experimental. Desde 18 h antes del ensayo a los animales se les suprimió la ingesta oral con excepción del agua.

Todos los animales fueron primados con una dosis de 2,2  $\times$  100.000.000 UFC de BCG por vía intraperitoneal (BCG Immunotherapeutic ImmunoCyst; Connaught Lab) 15 días antes, con el fin de aumentar el número basal de macrófagos activados y producir una mayor respuesta del TNF- $\alpha$ <sup>8</sup>.

El TNF- $\alpha$  tisular pancreático se evaluó en el homogeneizado obtenido del tejido pancreático que posteriormente centrifugado ofrecía una fracción citosoluble que permitía la determinación de la citada proteína. Para las mediciones se utilizó Factor-Test-X Mouse TNF alfa Elisa Test Kit (Code 80-2802-00).

En 4 ratas control se efectuó la cuantificación del TNF- $\alpha$  tisular pancreático (grupo C) y en 41 ratas se efectuó la misma determinación a diversos intervalos evolutivos, 1, 3, 12 y 24 h (grupos 1, 3, 12 y 24, respectivamente) tras la inducción de la PA en ratas mediante inyección retrógrada ductal de taurocolato sódico al 5%, según el modelo previamente publicado por nuestro grupo<sup>7</sup>.

TABLA 1. Estimaciones de TNF- $\alpha$  tisular pancreático en los diversos grupos evolutivos (82 determinaciones, 41 animales de experimentación)

Intervalo de la pancreatitis aguda (h)	Determinaciones	Muestra	Media
G1	1	22	11
G3	3	24	12
G12	12	18	9
G24	24	18	9

TABLA 2. Valores del TNF- $\alpha$  tisular pancreático. Test de la t de Student. Comparación entre el grupo control (C) y los distintos grupos evolutivos (1, 3, 12 y 24). Comparación de los distintos grupos evolutivos entre sí

	Grupo 1 (1 h)	Grupo 3 (3 h)	Grupo 12 (12 h)	Grupo 24 (24 h)
Control	t = 2,7	t = 7,8	t = 21	t = 2,8
Grupo C	p < 0,02	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,02
Grupo 1	t = 1	t = 2,5	t = 1,9	p = NS
Grupo 3	p = NS	p < 0,02	t = 0,9	t = 0,66
Grupo 12		p = NS	p = NS	t = 0,43
				p = NS

NS: no significativo.

Cada determinación se efectuó por duplicado obteniéndose, por tanto, 82 determinaciones del TNF- $\alpha$  en las 41 ratas evaluadas afectadas de PA.

## Resultados

El rango de concentración de proteínas totales en citosol fue de 2,6 a 5,8 mg/ml.

Los valores de TNF- $\alpha$  citosólico fueron expresados en pg/ml.

En el grupo control (C) y sobre 4 ratas los valores del TNF- $\alpha$  tisular pancreático fueron cuantificables y oscilaron entre 29,6 y 57,6 pg/ml, con un valor medio de  $43,3 \pm 7,7$ .

En la tabla 1 se presentan los resultados de los valores del TNF- $\alpha$  en los distintos grupos evolutivos con el rango y el número de componentes de cada grupo.

Evaluados los resultados y aplicando el test de la t de Student, con significación estadística para  $p < 0,05$ , se obtuvieron las siguientes comparaciones comparando los valores control (grupo C) con los diversos intervalos de PA (grupos 1, 3, 12 y 24) (tabla 2).

La evolución de los valores del TNF- $\alpha$  en los distintos intervalos de sacrificio se exponen en figura 1 y se comparan con los valores obtenidos en la rata sana.

## Discusión

Nuestra experiencia previa en el intento de determinación del TNF- $\alpha$  plasmático durante el proceso de la PA aguda experimental en la rata resultó infructuoso y fue publicado previamente<sup>8</sup>.

Con dicha metodología habíamos detectado valores del TNF- $\alpha$  en la rata en modelos experimentales de tipo séptico<sup>9</sup>.

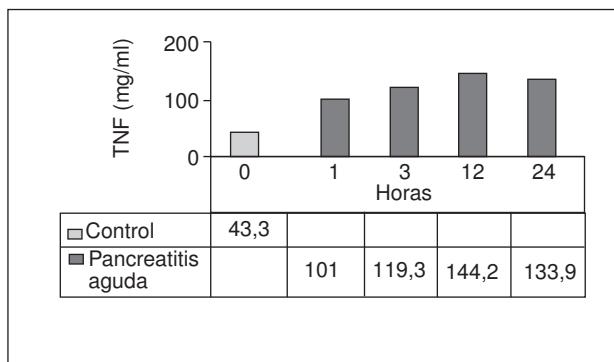


Fig. 1. Evolución de los valores del TNF- $\alpha$  tisular pancreático durante los distintos intervalos evolutivos de la pancreatitis aguda y su relación con el control basal.

Parece ser que el método utilizado condicionaba la no detección de la proteína inflamatoria de acuerdo con publicaciones recientes de otros autores en la PA experimental<sup>10,11</sup>.

Del presente estudio se pretende resaltar la posibilidad de determinación del TNF- $\alpha$  tisular pancreático, su elevación de forma homogénea en relación con el desarrollo de la PA grave experimental y, por tanto, su posibilidad de ser aplicado como un factor más de predicción de mala evolución, ya que se trata de un modelo experimental de alta letalidad<sup>7</sup>.

Otro aspecto a destacar es la precocidad en la elevación de los valores del TNF- $\alpha$  tisular, pues a la hora de la inducción de la PA ya multiplica por 2,5 los valores medios obtenidos en los controles.

En la actualidad aún persiste la búsqueda de factores pronósticos de precocidad contrastada<sup>4</sup> que permitan clasificar cuanto antes a los pacientes afectados de PA en dos grupos clínicos claramente diferenciados; por tanto, requerirán una monitorización y un tratamiento muy distintos.

Como posibilidad de aplicación clínica se apunta la posibilidad de correlacionar los valores del TNF- $\alpha$  tisular pancreático que se pueden obtener en los pacientes en los que se decide

puncionar la necrosis pancreática con el valor de diversas interleucinas plasmáticas y, obviamente, con el ulterior comportamiento clínico del paciente.

Es también una realidad clínica la imposibilidad, en ocasiones, de confirmar la infección de la necrosis a pesar de su punción y la mala evolución del paciente.

## Bibliografía

- Bradley EL. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the Atlanta Symposium. Arch Surg 1993; 128: 586-590.
- Dervenis C, Johnson CD, Bassi C, Bradley E, Imrie CW, McMahon MM et al. Diagnosis, objective assessment of severity and management of acute pancreatitis. Int J Pancreatol 1999; 25: 195-210.
- Glazer G, Mann DV. United Kingdom guidelines for the management of acute pancreatitis. Gut 1998; 42 (Supl 3): 1-13.
- Armengol M, Oller B, Escudero LE, Roca J, Gener J, Rodríguez N et al. Specific prognostic factor secondary infection in severe acute pancreatitis. Dis Surg 1999; 16: 125-129.
- Armengol M. Interleucinas como factores predictivos de la evolución de la pancreatitis aguda. Cir Esp 2000; 68: 185-187.
- Rau B, Steinbach G, Gansage J, Mayer JM, Guinert A, Beger HG. The role of procalcitonin and interleukin-8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. Gut 1997; 41: 832-840.
- Rueda JC, Ortega L, Argüello JM, Landa JI, Balibrea JL. Pancreatitis aguda experimental en la rata. Cuantificación de la necrosis pancreática tras la inyección retrógrada ductal de taurocolato sódico. Rev Esp Enf Dig 1991; 80: 178-182.
- Landa García JI, Villetta R, Alcalde J, Navarro JA, Arenas J, Sánchez JA et al. Valores plasmáticos de TNF-alfa y de nitratos/nitritos en el curso evolutivo de la pancreatitis aguda experimental. Cir Esp 1996; 60: 81-85.
- Landa JI, Álvarez Sánchez J, Grau M, Sánchez JA, Balibrea JL. Somatostatin reduces the levels of tumor necrosis factor alpha in a rat model of endotoxemia induced by lipopolysaccharide. Res Exp Med 1995; 195: 317-325.
- Hughes CB, Gaber LW, Kotb M, Mohey el-Din AB, Pabst M, Gaber AO. Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of primary role for tumor necrosis factor-alpha. Surgery 1995; 117: 201-205.
- Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. Ann Surg 1999; 229: 230-236.