

11215

36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

EFFECTO DEL INTERFERON GAMMA SOBRE LA FIBROSIS PANCREATICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PANCREATITIS CRONICA EN RATAS

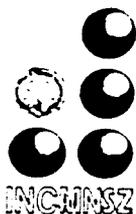
TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

ESPECIALISTA EN GASTROENTEROLOGIA

P R E S E N T A :

DR. ALFONSO ZETINA LOPEZ



MEXICO, D. F.

OCTUBRE 2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dra. CONCEPCION GUTIERREZ
ASESORA
LABORATORIO DE GASTROENTEROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

Dr. GUILLERMO ROBLES DÍAZ *Robles Díaz*
TUTOR
PROFESOR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN
GASTROENTEROLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

[Signature]
Dr. DAVID KERSHENOBICH S.
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D.F.

[Signature]
Dr. LUIS USCANGA DOMÍNGUEZ
JEFE DE LA DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por brindarme el conocimiento para alcanzar una nueva meta.

A mis **PADRES** (*Alfonso y Alicia*) por brindarme todo el apoyo y amor para poder lograrlo.

A mi **ESPOSA** (*Alejandra*) por el amor, sacrificio y paciencia durante este tiempo.

A mi **HIJO** por ser una nueva luz e inspiración en mi vida.

A mis **MAESTROS**, especialmente a los *Doctores Robles, Campuzano, Villalobos, Olivera Uscanga y Kershenobich* por transmitirme sus conocimientos y ser un ejemplo a seguir durante la vida profesional.

A mis **COMPAÑEROS** (*Aldo, Luis Enrique, Gustavo, Francisco, Octavio, Sergio, Mario, José María, Aldo J, Juan Carlos Pablo y Edgar*) por todos los momentos agradables, su ayuda y apoyo.

Al personal del Departamento de Gastroenterología en especial a Gabriela Gutiérrez, Lourdes Morales, Lourdes Zamora y Leticia Sánchez.

Un especial agradecimiento al Dr. Orozco, José Luis Díaz y Alina Hernández ya que sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

I N D I C E

Resumen	01
Introducción	03
Objetivos	08
Hipótesis	09
Material y Método	10
Resultados	15
Discusión	18
Conclusiones	24
Bibliografía	25
Anexos	36

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La Pancreatitis Crónica (PC) es un proceso dinámico caracterizado por la sustitución del parénquima pancreático por tejido fibroso, haciendo que se pierda la función exocrina y endocrina de este órgano. Uno de los pocos modelos reproducibles en animales de experimentación capaz de conseguir cambios histológicos característicos de PC, puede ser útil para evaluar el efecto del interferón gamma (IFN- γ) para reducir la transcripción de TGF-beta, disminuyendo por ende la producción de colágena I y III. En los estudios realizados en fibrosis pulmonar idiopática se ha demostrado su capacidad para disminuir hasta el 50% de la producción de colágena I y III.

OBJETIVO: Evaluar el efecto de IFN- γ sobre la fibrosis pancreática en un modelo experimental de PC en ratas.

METODOLOGÍA: Se utilizaron 38 ratas Wistar macho con peso promedio de 220–240 gr. El protocolo incluyó dos fases, la primera consistió en inducir fibrosis pancreática mediante el uso de ciclosporina y ceruleína y la segunda consistió en la aplicación de IFN- γ . Se formaron 2 grupos, el Grupo Experimental que incluyó 32 ratas a quienes se les aplicó ciclosporina 20 mg / kg ip cada día y ceruleína 100 μ g / kg ip en el día uno y ocho por 2 semanas, al concluir esta condición se pasó a la segunda fase en donde se aleatorizaron en dos subgrupos de 16 ratas cada uno, el que recibió tratamiento con IFN- γ 600 UI/d ip cada día por una semana y el no tratado que solo recibió solución salina con el mismo esquema de aplicación. El grupo control incluyó 6 ratas a quienes durante todo el protocolo solo se les aplicó solución salina. En ambos grupos se determinó cada semana el peso, concentración sanguínea de enzimas pancreáticas (amilasa y lipasa) y TGF-beta, cambios en el tejido pancreático en histología (grado de fibrosis e inflamación) y en

marcadores de estrés oxidativo (glutathion y malondialdehido) Los resultados se expresaron como medias \pm desviacion estandar, los grupos fueron comparados mediante la prueba de U-Mann-Whitney y ANOVA, considerando significativo un valor de $p < 0.05$

RESULTADOS: A la segunda semana de la induccion de PC no existieron diferencias en la variación del peso entre los subgrupos experimentales, pero si fue menor el incremento al comparar ambos con el grupo control ($p < 0.001$), aunque es de hacer notar que después de recibir IFN- γ las ratas aumentaron de peso comparativamente con las del subgrupo no tratado ($p=0.001$) No existieron diferencias en las concentraciones de amilasa y lipasa basales Después de la induccion de pancreatitis las concentraciones de amilasa fueron menores en ambos subgrupos experimentales ($p < 0.002$) Las concentraciones de amilasa aumentaron después de una semana de tratamiento con IFN- γ , desapareciendo la diferencia con el control Las concentraciones de lipasa fueron significativamente más bajas en el subgrupo de PC que no recibió IFN- γ ($p=0.018$) El puntaje de fibrosis tendió a ser menor en las ratas con PC que recibieron IFN- γ comparado con las del subgrupo no tratado ($p=0.062$) No existieron diferencias en los marcadores de estrés oxidativo entre las diferentes condiciones estudiadas Las concentraciones de TGF- β fueron mas altas en el grupo de PC tratado que en el sin tratar y que en el control ($p=0.003$)

CONCLUSIONES: El uso de IFN- γ mejora el peso de las ratas con PC, aumenta las concentraciones sanguineas de enzimas pancreaticas y tiende a reducir el grado de fibrosis No puede establecerse un papel patogenico al estres oxidativo de acuerdo a los marcadores utilizados, ni tampoco al TGF- β en la fibrogenesis según lo esperado, sin embargo, hay evidencia para establecer que el concepto de irreversibilidad del daño funcional y anatómico de la PC es relativo

INTRODUCCIÓN

La pancreatitis crónica (PC) se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio y la destrucción progresiva de las células acinares y su reemplazo por tejido fibroso (1,3) Cada año en EUA se diagnostican 20 casos nuevos de PC por cada 100,000 (2) Un estudio realizado en el INNCMSZ demostró una incidencia de PC de 4.4 por cada 1,000 pacientes hospitalizados (3)

Se han desarrollado algunos modelos experimentales de PC teniendo como fin entender fenómenos específicos de la patogénesis y modalidades terapéuticas de esta enfermedad. Los modelos animales no reproducen todos los aspectos de la enfermedad humana, sin embargo, han contribuido a comprender la fisiopatología de la misma. Los modelos experimentales *in vitro* son inadecuados para este fin, ya que no reproducen los complejos efectos sobre otros órganos y sistemas. Los estudios experimentales en animales permiten disminuir la variabilidad con la que la PC se puede presentar en el hombre y así poder evaluar un aspecto específico de esta, ya que en experimentos se utilizan animales de la misma edad, sexo y consanguinidad, con homogeneidad y sincronización en la agresión pancreática, haciendo factible producir un daño similar en todos los animales (4)

Mientras que existen muchos modelos de pancreatitis aguda (PA), pocos han logrado reproducir la PC. Varios diseños han tratado de inducir PC después de ataques repetidos de PA, por ejemplo, un modelo indujo seis episodios de PA con ceruleína cada semana y, después de la inducción se administró factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

recombinante, produciendo fibrosis perilobular e intralobular pancreática (4) Otro modelo utilizó ciclosporina, después de la inducción con ceruleína, mostrando que la administración repetida de ciclosporina favoreció el desarrollo de fibrosis pancreática, (5) ya que ésta produce daño pancreático, además de otros efectos que incluyen nefrotoxicidad y pérdida de peso en los animales tratados (6) Otro modelo más, utiliza Dicloruro de Dibutiltin (DBTC), produce edema del conducto biliar-pancreático y secreción amarilla verdosa (producto de la necrosis e inflamación de las células ductales), condicionando obstrucción y produciendo daño al parenquima pancreático, observando que la fibrosis es dosis y tiempo dependiente de la administración del DBTC (7) Recientemente se informó un nuevo modelo de PC que fue realizado en ratas MRL- + a las que se les administró ácido poliinosínico policitídilico produciendo características de pancreatitis autoinmune (1)

Nuestro grupo logró producir cambios de PC en ratas en forma reproducible y con baja mortalidad, con un diseño experimental (8) modificando uno previo informado en la literatura (5) y que será usado en este estudio

Modelos de PA como el de dosis supramáxima de ceruleína, (9), dieta con déficit en colina y suplementada en etionina (10,11), ligadura del conducto pancreático (12), infusión pancreática intraductal de taurocolato de sodio (13) y administración de cloruro de calcio (14) han demostrado destrucción aguda del parenquima del páncreas con altas concentraciones séricas de enzimas pancreáticas. En contraste, los niveles de estas enzimas son bajos en modelos de PC en ratas ya sea con ceruleína y estrés (15), con ácido sulfónico de trinitrobenzeno (16) y en ratas WBN:Kob con PC espontánea (17,18)

Los radicales libres han sido implicados en el daño producido durante la pancreatitis. Existe un balance entre radicales libres y antioxidantes, el desequilibrio de estos sistemas origina el daño tisular (19-21). El estrés oxidativo es capaz de activar a las células estelares hepáticas y generar fibrosis (22). Por la similitud de estas células con sus homólogas pancreáticas se ha cuestionado si este factor es capaz de producir el mismo efecto en el páncreas. Casini y cols demostraron un incremento en la fibrosis procedente de células estelares activadas en tejido circundante a las áreas con estrés oxidativo en pacientes con PC alcohólica. Este hallazgo se asoció con un incremento en la producción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β (23). Por otro lado la inhibición de la enzima superóxido dismutasa que está involucrada en la primera línea de defensa contra los radicales libres, ocasionó fibrosis inter e intralobulillar con atrofia de las células acinares (24). El estrés oxidativo ocasionado por el alcohol es capaz de inducir fibrogenesis en cultivos de células estelares de páncreas de rata (25), que disminuye al agregar vitamina E como antioxidante sugiriendo que este efecto es mediado por la reducción en los niveles de TGF- β . (26)

La fibrosis es el cambio anatómico más característico de la PC, asociado a infiltración por células inflamatorias, hasta el momento no existe tratamiento que revierta esta lesión que se produce por el desbalance entre síntesis y degradación de colágeno, llevando a una desproporción entre parénquima y estroma (27,28). No se conocen a fondo los mecanismos responsables de la activación, progresión y perpetuación de la fibrogenesis pancreática (7,24,29)

El TGF- β es una citocina mediadora de fibrosis en cirrosis hepática, glomerulonefritis, fibrosis pulmonar idiopática y PC. ya que estimula la síntesis de matriz extracelular e inhibe su degradación (29-30) también se ha descrito que juega un papel importante en el desarrollo de fibrosis en modelos de PA y PC (5,29,31) El uso de anticuerpos contra TGF- β disminuye significativamente la matriz extracelular y la síntesis de fibronectina, colágenos I y III (32,33) Además participa en el reclutamiento y diferenciación de células inflamatorias, consideradas principales responsables de la fibrosis hepática (34) Apte y cols demostraron que la activación de las células estelares en el páncreas de rata producía colágenos I y III, fibronectina y laminina (35) Actualmente se considera a las células estelares como los principales agentes en el proceso de fibrogénesis en hígado y páncreas (5,23,36)

En un inicio los interferones fueron usados farmacológicamente por sus propiedades antivirales, incluso en la actualidad el IFN- α es parte del tratamiento de elección para hepatitis viral crónica (37) Sin embargo, Prior y cols demostraron que el 56% de pacientes con fibrosis pulmonar tienen deficiencia en la producción linfocítica de interferón gamma (IFN- γ), y que esta deficiencia se asocia a peor pronóstico (38) Además se había informado previamente que los pacientes con sarcoidosis con concentraciones bajas de IFN- γ tenían una mayor "tendencia fibrotica" (39) Por lo tanto, al estudiar en modelos de fibrosis pulmonar la administración de IFN- γ se demostró que es capaz de disminuir en 50% la producción de colágenos tipo I y III por los fibroblastos (40) Un informe preliminar del uso de IFN- γ en pacientes con fibrosis pulmonar primaria mostró disminución de los niveles de transcripción del TGF- β en el tejido pulmonar después de seis meses de tratamiento, asociándose a mejoría clínica Además, los autores demostraron que no había

producción pulmonar de IFN- γ e incremento de 7 veces la producción de TGF- β , comparada con el grupo control (41) Por el efecto bloqueador del TGF- β sobre el IFN- γ (42, 43), se sugiere que en las enfermedades caracterizadas por fibrosis, la inflamación crónica puede llegar a desarrollar deficiencia adquirida del IFN- γ favoreciendo la actividad fibrogénica del TGF- β .

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- 1) Evaluar el efecto del IFN- γ sobre la fibrosis pancreática en un modelo experimental de PC en ratas

OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- 1) Conocer la variación en el peso, enzimas pancreáticas y TGF- β sanguíneos, estrés oxidativo y fibrosis pancreática entre animales con PC que recibieron IFN- γ comparado con un grupo no tratado y un control sin daño pancreático

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA

La administración de IFN- γ **NO** mejora el peso, **NO** devuelve la capacidad secretora de las enzimas pancreáticas, **NO** reduce el estrés oxidativo en el páncreas y **NO** disminuye el grado de fibrosis pancreática ni los niveles sanguíneos de TGF- β 1

HIPÓTESIS ALTERNA

La administración de IFN- γ mejora el peso, devuelve la capacidad secretora de las células acinares, reduce el estrés oxidativo del tejido pancreático, el grado de fibrosis pancreática y los niveles de TGF- β 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar macho que fueron mantenidas segun protocolo de bioterio, siguiendo los lineamientos éticos de trabajo de la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio y experimentacion NOM-062-ZOO-1999 y contando con la aprobacion del Comitè de Etica y de Investigacion en Animales del INCMNSZ

El protocolo incluy6 dos fases. La primera consisti6 en inducir fibrosis pancreática mediante el uso de ciclosporina y ceruleina. La segunda fase consisti6 en la aplicaci6n de IFN- γ

1. MODELO EXPERIMENTAL

Ratas macho con peso promedio de 220-240 gr (N=38) agrupadas en dos grupos

GRUPO EXPERIMENTAL: (N=32) Las ratas fueron tratadas con ciclosporina (Novartis, Mexico) (dilucion 1:4 en soluci6n salina) 20 mg / kg ip cada dia por 2 semanas y ceruleina (Sigma, St. Louis, EUA) 100 μ g / kg ip en el dia uno y ocho. Al finalizar la fase de inducci6n de fibrosis pancreática a la segunda semana, se aleatorizaron en dos subgrupos experimentales (N=16 cada uno)

- 1) Recibir IFN- γ (Gibco, Rockville, EUA) 600 UI/d ip diariamente por una semana con ratas de un peso promedio de 230 gr
- 2) Recibir unicamente soluci6n salina con ratas de un peso promedio de 230 gr

GRUPO CONTROL: Incluy6 6 ratas con peso promedio de 240 gr que fueron tratadas unicamente con soluci6n salina (Tabla I)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. VARIABLES ANALIZADAS

I) PESO

Las ratas fueron pesadas al inicio del protocolo y cada semana durante el periodo de estudio. El peso fue expresado en gramos.

II) ENZIMAS PANCREÁTICAS

Se realizaron 3 mediciones de enzimas pancreáticas (días 1 y 8 y al sacrificio). Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a través de punción capilar heparinizada del seno esfenoidal de las ratas 6 horas después de la inducción de la pancreatitis con ceruleína (días uno y ocho), fueron centrifugadas a 2,200 rpm por 15 min. para separar la capa de leucocitos del plasma. El plasma fue recolectado en crioviales para la medición de la concentración de amilasa y lipasa. Igualmente al sacrificarlas se obtuvieron 5 ml de sangre por punción intracardiaca utilizando una jeringa heparinizada.

AMILASA: Se disolvió el amortiguador, se llevó a temperatura ambiente y se mezcló con el plasma, se incubó por 4 minutos y se midió a 405 nm de absorbancia utilizando un método automatizado por medio de un autoanalizador Synchron CX7-D2.

LIPASA: Se mezcló el plasma con agua desionizada a temperatura ambiente y se midió a 340 nm en absorbancia utilizando un método automatizado por medio de un autoanalizador Synchron CX7-D2.

Los resultados de amilasa y lipasa se expresaron en U/ml.

III) CAMBIOS EN TEJIDO PANCREÁTICO

Al final del estudio, las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia con administración de pentobarbital sodico a razon de 120 mg/kg ip. Previo al sacrificio se extrajeron 5 ml de sangre de cada rata mediante puncion intracardiaca con una jeringa heparinizada, posteriormente mediante laparotomia abdominal, se extrajo y separó el páncreas de los tejidos adyacentes. Una porcion de tejido pancreatico fue incluida en formaldehido al 10% para su conservacion y estudio histopatologico, otra porcion fue congelada inmediatamente en nitrógeno liquido para la determinacion de marcadores de estrés oxidativo.

IIIa) GRADO DE FIBROSIS

Los especimenes de pancreas fueron conservados en formaldehido para su posterior inclusion en bloques de parafina. Se les realizo tincion de hematoxilina y eosina (H&E) y tricómico de Masson. En el tejido pancreatico se valoró el grado de fibrosis de cada especimen y la infiltración linfo-monocitica, asi como el grado de inflamacion peripancreatica. La fibrosis se clasifico de la siguiente manera:

GRADO	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
0	Normal, Tejido pancreatico sano
1	Tejido con fibrosis intralobular leve, sin infiltrado celular intralobular y tejido peripancreatico con infiltracion celular
2	Fibrosis intralobular moderada, infiltrado celular intralobular y del tejido peripancreatico
3	Fibrosis intralobular intensa, infiltrado intralobular y peripancreatico intenso

IIIb) EVALUACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

Al tejido pancreático se le retiro la grasa y los nódulos linfáticos, fue pesado, congelado y liofilizado. Se preparó la homogenización del tejido mediante el uso del esquilador de motor (Tissue Terror 985-370, Biospec Products Inc, Drewel, Winconsin, USA)

Lipoperoxidación mediante el ensayo del malondialdehído (MDA): Se homogeneizaron aproximadamente 100 mg del tejido pancreático con 1 ml de solución salina al 0.9%, se adicionó 2 ml de solución reactiva (mezcla de TCA, TBA y HCl). Se incubo en baño Maria por 30 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente, se tomaron 500 ul del sobrenadante y se leyó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en nmol de malondialdehído/mg de proteína

Glutación: Se homogeneizo aproximadamente 100 mg de páncreas con 1 ml de solución salina al 0.9%, se coloco en hielo y se lisaron las células con el sonicador por 5 segundos (6 veces), se tomaron 500ul del homogeneizado y se agregó 1 ml de buffer de solubilización (SDS 1%, Tris base 0.2M, EDTA 0.002 M pH8), se dejó reposar 15 minutos y se adiciono 1 ml de TCA 5%, se agitó y se centrifugó a 6000 rpm a 4°C por 15 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia a 412 nm. Los resultados fueron expresados en nmol de Glutacion / mg de proteína

IV) MEDICIÓN DE TGF- β

Se realizó medición cuantitativa del TGF- β 1 en plasma utilizando el ensayo inmunoenzimático para TGF- β 1 (R&D System) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los resultados se expresaron en ng/ml.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del peso, concentraciones de enzimas pancreáticas (amilasa y lipasa), estrés oxidativo y cambios histológicos se expresaron como medias \pm desviaciones estándar, los grupos fueron comparados mediante la prueba estadística de U-Mann-Whitney y ANOVA. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

I) EVALUACIÓN DEL PESO (Tabla II)

A la segunda semana de inducción de PC no existieron diferencias en el peso entre los dos subgrupos experimentales que se formaron, sin embargo, ambos subgrupos fueron diferentes del control ($p=0.000$), después de una semana de administración del INF- γ se demostró un aumento de peso en el subgrupo tratado con comparado con el subgrupo experimental sin INF- γ ($p=0.001$). Es de hacer notar que el grupo control siguió ganando más peso que ambos grupos experimentales ($p=0.000$)

II) ENZIMAS PANCREÁTICAS (Tabla IIIa y IIIb)

No existieron diferencias en las concentraciones de amilasa basal en los 3 subgrupos al inicio del estudio. En las determinaciones después de la aplicación de ceruleína y ciclosporina (semana 1, 2 y al sacrificarlas), las concentraciones de amilasa fueron menores en el subgrupo experimental sin INF- γ ($p=0.02$, 0.003 y 0.004 , respectivamente) al compararlas con el grupo control. En el subgrupo experimental con INF- γ las concentraciones de amilasa fueron menores en las 2 primeras determinaciones ($p=0.01$, 0.001 , respectivamente), sin embargo en la última medición después de la aplicación de INF- γ desapareció la diferencia con los controles ($p=0.1$). Al comparar ambos subgrupos experimentales no existieron diferencias significativas durante las 2 primeras semanas, sin embargo, después de la aplicación del INF- γ , el subgrupo tratado mostró tendencia a mayores concentraciones de amilasa ($p=0.061$)

No existieron diferencias significativas en la concentración de lipasa al comparar los grupos, excepto al final del estudio en donde se encontró que el subgrupo con PC no tratado con INF- γ tenía niveles mas bajos comparado con el subgrupo con tratamiento ($p=0.018$).

III) CAMBIOS TISULARES PANCREÁTICOS (Tabla IV)

a) Valoración Histológica (Tabla IV)

El promedio de fibrosis en el subgrupo tratado con INF- γ fue de 1.36 (limites 1-2) grados y en el subgrupo experimental que recibió solución salina fue de 1.90 (limites 1-3), demostrando tendencia a la disminución de la fibrosis en el primero ($p=0.062$), el grupo control no presentó evidencia de fibrosis (0 grados), siendo esta diferencia significativa al compararla con los dos grupos experimentales ($p=0.000$)

b) Estrés Oxidativo

El MDA en el subgrupo experimental sin INF- γ fue de 5.65 ± 7.91 nmol/mg-proteína, en el subgrupo experimental tratado con INF- γ fue de 2.74 ± 3.66 nmol/mg-proteína y en el grupo control de 3.11 ± 2.63 nmol/mg-proteína; sin embargo no existieron diferencias significativas al comparar todos los grupos. Tampoco hubo diferencia en la concentración de glutatión que en el subgrupo experimental sin INF- γ fue de 246.20 ± 245.81 nmol/mg-proteína, en el subgrupo con INF- γ de 265.44 ± 262.08 nmol/mg-proteína y en el subgrupo control de 222.27 ± 144.67 nmol/mg-proteína.

IV) MEDICIÓN DE TGF- β 1 (Tabla V)

Las concentraciones de TGF- β en el subgrupo tratado con IFN- γ fueron mayores comparadas con el subgrupo no tratado y el grupo control ($p=0.003$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

• PESO

En las ratas experimentales observamos una disminución significativa de peso debido a que la ciclosporina produce inhibición del apetito y del mecanismo de la sed, además de su toxicidad pancreática y sistémica (52, 53) Se ha descrito también que produce inhibición del crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro*. (54) La suspensión de su aplicación resulta en la reversión de sus efectos (50, 54), lo que no se observó en la primera semana posterior a suspenderse, excepto cuando se dió el IFN- γ .

• AMILASA Y LIPASA

En el modelo de PA se espera encontrar una elevación de las concentraciones de amilasa y lipasa, después de producir inflamación aguda por la administración de ceruleína, sin embargo, en este modelo los niveles de amilasa disminuyeron, sugiriendo que las enzimas pancreáticas se ven disminuidas debido al efecto de la ciclosporina, ya que cambia la respuesta inflamatoria inducida por la estimulación pancreática supramáxima (53) Además estos niveles enzimáticos pueden cambiar por la ciclosporina dependiendo de la dosis y el tiempo de administración, por ejemplo se ha encontrado que la administración de una sola dosis de ciclosporina es capaz de incrementar los niveles de amilasa (55) y dosis menores administradas cada semana no producen cambios. La reducción posterior de los niveles enzimáticos se debe a que la ciclosporina produce atrofia de células acinares y reducción del número de receptores muscarínicos con disminución de la síntesis de DNA y proteínas (56, 53) Otros autores han reportado disminución de la función de células endocrinas pancreáticas al demostrar niveles más altos de glicemia y menor concentración de insulina

3 semanas después del tratamiento con ciclosporina (45) No encontramos diferencia significativa en los niveles de lipasa, lo que probablemente refleje la mayor reserva pancreática de esta enzima, o que no exista paralelismo en la secreción y producción de las enzimas o bien que sus valores más altos se deban a una vida media mayor comparada con la amilasa (57)

• VALORACIÓN HISTOLÓGICA

Existió diferencia significativa entre los subgrupos experimentales comparados con el grupo control. La fibrosis fue más evidente al utilizar la tinción de tricromico de Masson, resultando ser un modelo reproducible de PC dado que todas las ratas experimentales desarrollaron fibrosis pancreática (rangos 1 -- 3)

• ESTRÉS OXIDATIVO

Las concentraciones de glutatión fueron más elevadas en los subgrupos experimentales comparados con el grupo control, fenómeno opuesto a lo descrito en PC en donde se consume por las especies reactivas de oxígeno. Esta diferencia puede deberse a que el estrés oxidativo ocurre durante las primeras horas de la lesión aguda y nosotros determinamos las concentraciones al final del periodo de observación (19, 21, 48) Por otro lado, otra probabilidad que explique la falta de elevación de MDA es que existan más proteínas que pueden ser modificadas por la lipoperoxidación y que no fueron cuantificadas en este estudio, por ejemplo, en un modelo de PC espontánea en ratas WBN kob al medir los productos de lipoperoxidación, las proteínas modificadas por 4-hidroxi-2-nonanal y

malondialdehído fueron negativas y se formaron proteínas modificadas para 4-hidroxi-2-hexenal que fueron positivas (18)

El estrés oxidativo no es el único factor patogénico en la PC, actualmente se está dando mucha importancia a las células inflamatorias en el desarrollo de fibrosis, en modelos experimentales de obstrucción del conducto pancreático se ha demostrado un incremento de linfocitos CD8+, (28) nuestros resultados mostraron que existía infiltrado inflamatorio en el tejido peripancreático proporcional al puntaje de fibrosis, lo que indica que las células inflamatorias juegan un papel importante en la fibrogenesis

- **TGF- β**

Se ha demostrado un incremento en la expresión de TGF- β durante la PA inducida por ceruleína, normalizándose 7 días después, (58) lo que podría explicar las concentraciones normales encontradas en nuestro modelo, ya que la medición se realizó al final del estudio. De la misma manera, Vaquero y cols usando un modelo similar al de este estudio, con administración de ciclosporina, demostraron una máxima elevación plasmática de TGF- β al día 7 con un descenso progresivo posterior, (5) aunque mantiene niveles más altos que los controles. En nuestro caso no tenemos explicación para los resultados encontrados

- **EFEECTO DEL INTERFERÓN GAMMA**

Demostramos que el subgrupo que recibió IFN- γ no solo dejó de bajar de peso, sino que aumento comparado con el subgrupo no tratado. Entre las propiedades del IFN- γ incluyen la activación de macrófagos, como factor pro-apoptico e incremento de la transcripción

del óxido nítrico (59) Parece ser que el INF- γ antagoniza los efectos producidos por la ciclosporina que llevan a disminuir el crecimiento, dato no informado previamente.

Al final del estudio el subgrupo tratado con INF- γ tenía mayores concentraciones de amilasa y lipasa comparado con el subgrupo experimental que no recibió INF- γ , aunque esta diferencia sólo fue significativa para la concentración de lipasa, sugiere que el INF- γ fue capaz de producir una recuperación funcional del páncreas, hecho no descrito previamente.

Con relación al estrés oxidativo, las ratas tratadas con INF- γ presentaron valores menores de lipoperoxidación y mayores de glutatión comparados con los subgrupos tratados con solución salina; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas y probablemente reflejen que el estrés oxidativo no juegue un papel importante en la patogénesis de la PC y que el efecto benéfico del INF- γ no sea a través de la modulación de los radicales libres, además de considerar que esto no puede ser descartado completamente en este estudio por lo antes mencionado.

Se observó una tendencia hacia la disminución de la fibrosis en el subgrupo tratado con INF- γ ($p=0.062$). La capacidad del INF- γ de inhibir la fibrosis se ha demostrado en modelos de fibrosis renal y hepática. Este es el primer estudio en demostrar su capacidad de disminuir la fibrosis en un modelo de PC. El mecanismo principal por el cual el INF- γ inhibe la fibrosis es mediante su modulación sobre las células estelares. En modelos *in vitro* (60,61) e *in vivo* se ha demostrado que el INF- γ disminuye la producción de colágeno de las

celulas estelares hepaticas Baroni y cols demostraron que las ratas que recibieron esta citocina junto con un inductor de fibrosis hepática, fue capaz de disminuir la proliferación de celulas estelares, redujo el area ocupada por celulas α -SMA positivas y disminuyo la colágena, laminina, fibronectina, y niveles de ARNm de procolágena tipo I (62)

Otros modelos han demostrado que la aplicacion de INF- γ produjo disminucion de la fibrosis, menor proliferación de celulas estelares, menor expresi3n de α -SMA, reducci3n en los niveles de ARNm de colágena tipo I en 36% comparado con el grupo control (63). Adem3s el INF- γ retarda la transformaci3n genotipica de las c3lulas estelares pancreaticas reduciendo la expresi3n de α -SMA (37)

El subgrupo experimental que recibió IFN- γ present3 niveles incrementados de TGF- β , hallazgo opuesto al esperado, ya que un mecanismo de acci3n del IFN- γ es producir disminuci3n de los niveles de TGF- β y por ende disminucion de la sintesis de colagena (64). Recientemente se inform3 que al aumentar la fibrosis (modelo de PC espont3nea) tambi3n aumentaba la expresi3n del RNAm de INF- γ (65), contrario a lo descrito que el INF- γ se encuentra bajo en fibrosis. Asi mismo, se ha informado que la ciclosporina tiene la capacidad de inhibir el TGF- β y con ello la fibrosis, (66) informe contradictorio segun lo informado por otros autores, hablandonos de que la gran variedad de efectos pleiotropicos de las citocinas, dependen del contexto en el que actúen

Actualmente se considera que la fibrosis es un proceso dinamico, que puede progresar o revertir, dependiendo de la continuidad del insulto o el factor predisponente o si se

modifica el microambiente de la matriz extracelular. Recientemente se ha demostrado la reversibilidad de la fibrosis en pacientes con hepatitis C (67), demostrando que el concepto tradicional de irreversibilidad de la cirrosis no es del todo cierto (68). Por lo tanto, la fibrosis pancreática también puede ser reversible de acuerdo a los hallazgos en nuestro estudio, abriendo un importante campo para evaluar mecanismos anti-fibroticos y fármacos para la misma, que podrían ser la base terapéutica para este tipo de enfermedades.

CONCLUSIONES

- 1) La administración de ceruleína junto con ciclosporina diaria produjo disminución en el peso de los animales, reducción de la amilasa plasmática y fibrosis pancreática, representando un modelo experimental reproducible de PC
- 2) El estrés oxidativo medido bajo las condiciones de este estudio no parece desempeñar un papel fundamental en el daño pancreático crónico, aun cuando se ha sugerido que es indispensable en las etapas iniciales de daño pancreático
- 3) El INF- γ fue capaz de revertir la pérdida de peso, las alteraciones en los niveles sanguíneos de enzimas pancreáticas y los cambios fibróticos del páncreas en un modelo experimental de PC

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

- 1) Miyazaki WM, Terrada M, Okada K, Mori S, Kanno H, Nose M. A novel autoimmune pancreatitis in MRL mice treated with polyinosinic polycytidylic acid. *Clin Exp Immunol* 2002,129 27-34.
- 2) Robles-Diaz G, Vargas F, Uscanga L, Fernandez-del Castillo C. Chronic Pancreatitis in Mexico City. *Pancreas* 1990, 5 479-483
- 3) Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Kondo T, Hayakawa T. Chronic Pancreatitis: Overview of Medical Aspects. *Pancreas* 1998, 16: 323-328.
- 4) Foitzik T, Holtz HG, Eibl G, Buhr H J. Experimental models of acute pancreatitis are they suitable for evaluating therapy? *Int J Colorectal Dis* 2000, 15 127-135
- 5) Vaquero E, Molero X, Tien X, et al. Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by ciclosporin in rats. *Gut* 1999,45 269-77
- 6) Midha R, Mackinnon SE, Wade JA, Evans PJ, Best TJ, Wong PY. Chronic cyclosporin A therapy in rats. *Microsurgery* 1992,13 273-6
- 7) Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, Nizze H, Jonas L, Lohr M, Liebe S, Emmrich J. Pancreatic Fibrosis in Experimental Pancreatitis Induced by Dibutyltin Dichloride. *Gastroenterology* 1997, 112 1664-1672

- 8) Diaz Rubio JL, Hernández-Evía A, Orozco-Estévez H, Zetina-Lopez A, Duarte A, Hernández-Pando R, Gutiérrez C, Robles-Díaz G. Un modelo experimental de Pancreatitis Crónica en Ratas, en prensa Resumen en la Revista de la Asociación Mexicana de Gastroenterología diciembre 2002
- 9) Griesbacher T, Rainer I, Evans DM. Inhibition of kinin action and kinin generation compared to dexamethasone pretreatment with respect to vascular effects and pancreatic enzymes in experimental acute pancreatitis. *Immunopharmacology* 1999; 43:219-24
- 10) Eubanks JW III, Sabek O, Kotb M, et al. Acute Pancreatitis Induces Cytokine Production in Endotoxin-Resistant Mice. *Ann Surg* Vol 1998, 227:904-911
- 11) Toivola DM, Baribault H, Magin T, et al. Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 1343-1354
- 12) Satake K, Hiura A. A new model for pancreatitis. *Pancreas* 1998, 16:284-288
- 13) Rau B, Bauer A, Wang A. Modulation of Endogenous Nitric Oxide Synthase in Experimental Acute Pancreatitis. Role of Anti-ICAM-1 and Oxygen Free Radical Scavengers. *Ann Surg* 2001, 233:195-203

- 14) Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Acute Hypercalcemia Causes Acute Pancreatitis and Ectopic Trypsinogen Activation in Rat. *Gastroenterology* 1995, 109: 239-246
- 15) Goto M, Nakano I, Kimura T, Miyahara T, Kinjo M, Nawata H. New chronic pancreatitis model with diabetes induced by cerulein plus stress in rats. *Dig Dis Sci* 1995;40: 2356-63
- 16) Puig-Divi V, Molero X, Vaquero E, Salas A, Guamer F, Malagelada J. Ethanol feeding aggravates morphological and biochemical parameters in experimental chronic pancreatitis. *Digestion* 1999, 60: 166-74
- 17) Ohashi K, Kim JH, Hara H, Aso R, Akimoto T, Nakama K. WBN/Kob rats: A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1990;6: 231-47
- 18) Furukawa F, Nishikawa A, Kasahara K, Miyauchi M, Nakamura H, Son HY, Uchida K, Hirose M. Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis in WBN/Kob rats. *Pancreas* 2001;22: 427-30
- 19) Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role oxidative stress in the pathogenesis of cerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 1999, 377: 1-11
- 20) Gomez-Cambronero L, Camps B, de La Asuncion JG, Cerda M, Pellin A, Pallardo FV, Calvete J, Sweiry JH, Mann GE, Vina J, Sastre J. Pentoxifylline ameliorates cerulein-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2000,293:670-6

- 21) Kruse P, Anderson ME, Loft S. Minor role of oxidative stress during intermediate phase of acute pancreatitis in rats. *Free Radic Biol Med* 2001,30:309-17
- 22) Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994,19:1262-71
- 23) Casini A, Galli A, Pignatola P, et al. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol* 2000,192:81-9
- 24) Matsumura N, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Harada H, Harada M. Study on Free Radicals and Pancreatic Fibrosis-Pancreatic Fibrosis Induced by Repeated Injections of Superoxide Dismutase Inhibitor. *Pancreas* 2001, 22: 53-57
- 25) Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, et al. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000,118:780-94
- 26) Molero X, Vaquero EC, Gomez-Valero JA, et al. Vitamin E attenuates collagen deposition during the development of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000,118(Suppl 2):A428,2203

- 27) Valderrama R, Navarro S, López JM, et al Synthesis and degradation of collagen in pancreatic fibrosis *Pancreas* 1999,18 34-8
- 28) Sparmann G, Behrend S, Merkord J, et al Cytokine mRNA Levels and Lymphocyte Infiltration in Pancreatic Tissue During Experimental Chronic Pancreatitis Induced by Dibutyltin Dichloride *Digestive Diseases and Sciences* 2001, 46 1647-1656
- 29) Van Laethem JL, Robberecht P, Resibois A, et al Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice *Gastroenterology* 1996,110 576-82
- 30) Van Laethem JL, Deviere J, Resibois A, et al Localization of transforming growth factor beta 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis *Gastroenterology* 1995;108 1873-81
- 31) Gress T, Muller-Pillasch F, Elsasser HP, et al Enhancement of transforming growth factor beta 1 expression in the rat pancreas during regeneration from caerulein-induced pancreatitis *Eur J Clin Invest* 1994,24 679-85
- 32) Menke A, Yamaguchi H, Gress TM, et al Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta1 in pancreatitis in the rat *Gastroenterology* 1997,113 295-303.
- 33) Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans *Gastroenterology* 1998,115 421-32

- 34) Pinzani M. New kids on the block pancreatic stellate cells enter the fibrogenesis world. *Gut* 1999,44 451-2.
- 35) Apte MV, Haber PS, Darby SJ. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999,44 534-41.
- 36) Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999, 155(4) 1087-95.
- 37) Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. *BMC Cell Biol* 2002 8;3(1):9.
- 38) Prior C, Haslam PL. In vivo levels and in vitro production of interferon-gamma in fibrosing interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1992,88 280-7.
- 39) Prior C, Haslam PL. Increased levels of serum interferon-gamma in pulmonary sarcoidosis and relationship with response to corticosteroid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1991,143:53-60.

- 40) Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets J Cell Physiol 1996,167 290-6
- 41) Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, et al A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis NEJM 1999,341 1264-9
- 42) Naganuma H, Sasaki A, Satoh E, et al Transforming growth factor-beta inhibits interferon-gamma secretion by lymphokine-activated killer cells stimulated with tumor cells Neurol Med Chir (Tokyo) 1996,36 789-95
- 43) Bonig H, Banning U, Hannen M, et al Transforming growth factor-beta1 supresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes Scand J Immunol 1999,50 612-8
- 44) Foitzik T, Forgacs B, Ryschich E, Hotz H, Gebhardt MM, Buhr HJ, Klar E Effect of different immunosuppressive agents on acute pancreatitis a comparative study in an improved animal model Transplantation 1998 27, 65 1030-6
- 45) Malmay MF, Moussamih-Kettani S, Labat C, Oustrin J, Houin G The dosing-time dependent influence of chronic cyclosporin A treatment on daily profiles of plasma glucose and insulin in the Wistar rat Chronobiol Int 1997,14 275-85

- 46) Cronin DC, Faust TW, Brady L, Conjeevaram, Jain S, Gupta P, Millis JM. Modern Immunosuppression Clinics in Liver Disease 2000, 4: 220-225.
- 47) Hopps V, Vetri P, Biondi F, Fontana G. Effects of cyclosporine A on the distribution of a glucose load. Clin Ter 1993;142: 311-22.
- 48) Weber H, Merkord J, Lonas L, Wagner A, Schroder H, Kading U, Werner A, Dummmler W. Oxygen Radical Generation and Acute Pancreatitis Effects of Dibutyltin Dichloride Ethanol and Ethanol on Rat Pancreas. Pancreas 1995, 4: 382-388.
- 49) Merkord J, Weber H, Sparmann G, Jonas L, Hennighausen G. The Course of Pancreatic Fibrosis Induced by Dibutyltin Dichloride (DBTC). Ann N Y Acad Sci 1999, 30 (880): 231-237.
- 50) Malmay MF, Kabbaj K, Labat C, Casse R, Oustrin J. Cyclosporine A dosing-time-dependent effects on plasma creatinine and body weight in male Wistar rats treated for 3 weeks. Chronobiol Int 1991, 8: 25-34.
- 51) Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. Clin Nephrol 1986;25 Suppl 1: S2-8.
- 52) Thiel G, Mihatsch MJ, Stahl RA, Hermle M, Brunner FP. Cyclosporine A nephrotoxicity in Goldblatt renovascular hypertension in rats. Clin Nephrol 1986;25 Suppl 1: S199-204.

- 53) Hirakawa K, Yoshimura N, Tsuchihashi Y, Mukainaka T, Ohkuma S, Kuriyama K, Oka T
Cyclosporine-induced morphological changes in rat exocrine pancreas *Transplant Proc*
1994, 26 2918-21
- 54) Bennett VJ, Detmar J, Chang PL. Growth inhibition by cyclosporine A in vivo and in vitro.
Life Sci 1991, 48 1455-61
- 55) Ito T, Kimura T, Yamaguchi H, Kinjo M, Sumii T, Nakano I, Nawata H. Acute pancreatitis
induced by cyclosporin A under stimulation of pancreas by caerulein *Pancreas* 1993;
8 693-9
- 56) Hirakawa K, Ohkuma S, Kuriyama K. Functional and morphological changes of the
exocrine pancreas in ciclosporin-treated rats *Eur Surg Res* 1991,23(5-6) 292-301
- 57) Yadav D, Agarwal N, Pitchumoni CS. A critical evaluation of laboratory tests in acute
pancreatitis *Am J Gastroenterol* 2002, 97 1309-18
- 58) Muller-Pillasch F, Menke A, Yamaguchi H, Elsasser HP, Bachem M, Adler G, Gress TM.
TGFbeta and the extracellular matrix in pancreatitis *Hepatogastroenterology* 1999
t,46 2751-6
- 59) Demols A, Le Moine O, Quertinmont E, van Laethem JL, Deviere J. Endogenous
Interferon Gamma Plays a Protective Role in Acute Experimental Pancreatitis in Mice
Pancreatology 2002, 2 217 A24

- 60) Rockey DC, Maher JJ, Jamagin WR, et al Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma Hepatology 1992,16 776-84
- 61) Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, et al Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture Hepatology 1995,21 1003-10.
- 62) Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, et al Interferon-gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis Hepatology 1996,23 1189-99
- 63) Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix RNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis J Invest Med 1994,42 660-70
- 64) Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression Exp Lung Res 1995,21 791-808
- 65) Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Sawabu N. Expression of Tumor Necrosis Factor-alfa, Interleukin-6, and Interferon-alfa in Spontaneous Chronic Pancreatitis in the WBN/Kob Rat Pancreas 2001, 22 (4) 400-408

- 66) Eickelberg O, Pansky A, Koehler E, Bihl M, Tamm M, Hildebrand P, Perruchoud AP, Kashgarian M, Roth M. Molecular mechanisms of TGF-(beta) antagonism by interferon (gamma) and cyclosporine A in lung fibroblasts. *FASEB J* 2001, 15: 797-806
- 67) Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002, 122: 1303-13
- 68) Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002, 122: 1525-8

ANEXOS

TABLA I

DESCRIPCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL GRUPOS Y SUBGRUPOS

Días ⇒	1	2-7	8	9-14	15-21	22
Subgrupo 1 experimental						
Subgrupo 2 experimental						
Grupo control						

Ciclosporina ip	
Ceruleína ip	
Solución Salina ip	
Interferón ip aplicado cada día a partir del día 15 hasta el día 21	
Sacrificio	

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

TABLA II

VARIACION DEL PESO (DELTA DE PESOS) (Peso expresado en gramos)

Grupo y Subgrupos (N)	Delta 0 - 2 semanas	Delta 2 - 3 semanas	Delta Inicio / Fin
Experimental sin INF- γ (N = 16)	- 24 \pm 13	- 3.20 \pm 17	- 25 \pm 24 *
Experimental Con INF- γ (N = 16)	- 15 \pm 27	27 \pm 20	10 \pm 27 * ϕ
Control (N = 6)	56 \pm 36	26 \pm 16	82 \pm 27

* Comparación entre grupo experimental y control ($p < 0.05$)

ϕ Comparación entre grupo experimental con INF- γ y sin INF- γ ($p < 0.05$).

TABLA IIIa

VALORES DE AMILASA ENTRE GRUPOS (MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR) (Amilasa expresada en U/ml)

GRUPO(n)	Amilasa Basal	Amilasa después 1 ^a dosis ceruleina	Amilasa después 2 ^a dosis ceruleina	Amilasa al final del protocolo
Experimental Sin INF- γ (N = 16)	1681 \pm 180	1246 \pm 113 *	1051 \pm 128 *	824 \pm 240 *
Experimental Con INF- γ (N = 16)	1575 \pm 65	1221 \pm 138 *	943 \pm 208 *	1108 \pm 324
Control (N = 6)	1572 \pm 69	1498 \pm 58	1566 \pm 99	1400 \pm 190

* Comparación entre grupo experimental y control ($p < 0.05$)

φ Comparación entre grupo experimental con INF- γ y sin INF- γ ($p < 0.05$).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TABLA IIIb

VALORES DE LIPASA ENTRE GRUPOS (MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR) (Lipasa U/ml)

GRUPO(n)	Lipasa Basal	Lipasa después 1ª dosis ceruleína	Lipasa después 2ª dosis ceruleína	Lipasa al final del protocolo
Experimento Sin INF- γ (N = 16)	12 \pm 1.0	14 \pm 0.5	15 \pm 3.6	14 \pm 1.2 ϕ
Experimento Con INF- γ (N = 16)	12 \pm 0.7	15 \pm 1.2	13 \pm 2.0	16 \pm 0.8 ϕ
Control (N = 6)	12 \pm 0.5	12 \pm 0.5	12 \pm 0.7	16 \pm 1.4

* Comparación entre grupo experimental y control ($p < 0.05$)

ϕ Comparación entre grupo experimental con INF- γ y sin INF- γ ($p < 0.05$).

TABLA IV

ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGIA (MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR)

Los valores de fibrosis están codificados de 0 a 3 dependiendo del grado de afectación histológica.

Las unidades de Maloldialdehido y Glutación están expresadas en nmol/mg proteína.

GRUPOS(N)	Maloldialdehido	Glutación	Fibrosis del Páncreas
Experimento Sin INF- γ (N = 16)	5.65 \pm 7.91	246.20 \pm 245.81	1.90 \pm 0.88
Experimento Con INF- γ (N = 16)	2.74 \pm 3.66	265.44 \pm 262.08	1.36 \pm 0.50
Control (N = 6)	3.11 \pm 2.63	222.27 \pm 144.67	0

* Comparación entre grupo experimental y control ($p < 0.05$)

ϕ Comparación entre grupo experimental con INF- γ y sin INF- γ ($p < 0.05$)

TABLA V
CONCENTRACIONES SANGUINEAS DE TGF- β 1
(ng/ml)

GRUPO (N)	TGF-beta
Experimental sin INF- γ (N = 16)	95.0 \pm 47.07
Experimental con INF- γ (N = 16)	152.1 \pm 16.7 * ϕ
Control (N = 6)	87.6 \pm 24.5

* Comparación entre grupo experimental y control ($p < 0.05$)

ϕ Comparación entre grupo experimental con INF- γ y sin INF- γ ($p < 0.05$).