André Siqueira Matheus

Efeito da inibição da produção de TNF- α por
meio da administração de pentoxifilina na
pancreatite aguda experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado

São Paulo
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Matheus, André Siqueira

Efeito da inibição da produção de TNF- α por meio da administração de pentoxifilina na pancreatite aguda experimental / André Siqueira Matheus. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Marcel Cerqueira Cesar Machado.

Descritores: 1.PANCREATITE NECROSANTE AGUDA 2.ÁCIDO TAUCOCÓLICO 3.INFLAMAÇÃO 4.FATOR DE NECROSE TUMORAL 5.PENTOXIFILINA/administração & dosagem 6.TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA 7.PANCRÊAS/microbiologia

USP/FM/SBD-077/06

“Celui qui mit ses pensées pour faire briller ses talents, doit s’attendre à la severité de ses critiques; mais celui qui n’écrit que pour satisfaire à un devoir, dont il ne peut se dispenser, à une obligation que lui est imposée, a sans doute des grands droits à l’indulgence de ses lectures et de ses judges.”

La Bruyère

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Médica 37 – LIM 37 da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, em colaboração com o Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP e Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Instituto Central do Hospital das Clínicas – ICHC. Projeto FAPESP 02/03773-6.

Dedico este trabalho à minha família base de
minha formação:

À minha amada esposa Sheila, pelo amor,
carinho e compreensão, presentes em todos
os momentos de nossas vidas.

Aos meus pais, José Mario e Maria Cecília,
aos meus irmãos, Henrique, Daniel e Tomaz,
pelo carinho, apoio e amor.

A querida Many, pelo amor e carinho
irrestritos e principalmente pelo apoio
fundamental pela minha formação.

Em homenagem ao meu querido e saudoso avô José Ulpiano de Almeida Prado, por sua vida, exemplo de caráter e honestidade, por todo apoio, incentivo e influência que exerceu em minha formação.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, por mais uma vez ter o privilégio de te-lo como orientador. A quem devo, o meu amadurecimento profissional e científico. Minha eterna gratidão pelo apoio e confiança depositados. Por seu exemplo de competência, dedicação e amor à medicina.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha, pelos ensinamentos, incentivo e sugestões. Por poder contar com seu apoio e principalmente pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. José Jukemura, pelo apoio, ensinamentos e sugestões. A quem devo grande parte de minha formação e principalmente por sua amizade e apoio. Pela grandiosa contribuição à minha vida profissional.

Aos Drs. André Luis Montagnini, Ricardo Jureidini, Emílio Elias Abdo e Sônia Penteado, pelo apoio, amizade, ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Dr. Dr. Marcel Autram Cesar Machado, pelo incentivo e sugestões fundamentais para a elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Telésforo Bacchella, pelas sugestões e apoio na elaboração desta tese.

Às amigas Sandra N. Sampietre, Nilza Aparecida T. Molan e Marcia S. Kubrusly, pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos Dr. Renato Soares de Godoy, Dra. Cíntia Yoko Morioka e Dr. Lourenilson José de Souza por todo apoio e companheirismo ao longo desta jornada.

À Dra. Rosely Antunes Patzina, pela elaboração da análise histológica deste projeto.

À Profa. Dra. Sônia Jancar, pelas sugestões, apoio e ensinamentos oferecidos para a realização desta pesquisa.

Às senhoras Rosilaine Souza Arruda e Jacinta Souza Alves, pelo fundamental apoio e serviços prestados para a realização do estudo microbiológico.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradecimento Especial

À amiga Ana Maria M. Coelho, a quem devo a realização deste trabalho, pelo auxílio fundamental e pelo carinho e amizade com o qual fui recebido e sempre fui tratado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP,
pelo fundamental suporte financeiro e científico oferecidos para o
desenvolvimento desta pesquisa, indispensáveis para sua realização –
Processo 02/03773-6.

Índice

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	12
3 – MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Aspectos éticos	13
3.2 Animais de experimentação	14
3.3 Delineamento experimental	14
3.4 Indução da pancreatite	16
3.5 Administração de pentoxifilina e solução salina	17
3.6 Dosagem de mediadores inflamatórios	19
3.7 Estudo Microbiológico	19
3.8 Análise histológica	22
3.9 Estudo da mortalidade	23
3.10 Análise estatística	25
4 – RESULTADOS	27
4.1 Dosagem de mediadores inflamatórios	27
4.2 Estudo microbiológico	31
4.5 Avaliação histológica	35
4.6 Mortalidade	38
5 – DISCUSSÃO	39
6 – CONCLUSÕES	46

7 – ANEXOS	47
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

Lista de abreviaturas

BHI - Brain Heart Infusion (Infuso cérebro-coração - meio de cultura)

CAPPesq - Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Teste de Ensaio Imunoenzimático)

EPM - Erro padrão da média

HC-FMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ICHHC - Instituto Central do Hospital das Clínicas

I- κ B - Proteína inibidora kappa B

IL-1 - Interleucina 1

IL-2 - Interleucina 2

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-11 - Interleucina 11

IMOS - Insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas

LIM - Laboratório de investigação médica

MAPK - Mitogen-activated protein kinase (Proteína quinase ativada por mitógeno)

m-RNA - Ácido ribonucléico mensageiro

NF- κ B - Fator de ativação nuclear kappa B

NIK - NF-kappaB inducing Kinase

NO - Óxido nítrico

PA - Pancreatite aguda

PAF - Fator de ativação plaquetária

PGE₂ - Prostaglandina E 2

PTX - Pentoxifilina

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SDRA - Síndrome do desconforto respiratório do adulto

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TNF-R - Receptor de TNF- α

TRADD - TNFRSF1A Associated via Death Domain

UFC - Unidade formadora de colônia

Resumo

MATHEUS, AS. Efeito da inibição da produção de TNF- α por meio da administração de pentoxifilina na pancreatite aguda experimental

Pancreatite aguda é uma das principais causas de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Complicações sistêmicas são os principais fatores responsáveis pela ocorrência de falência de múltiplos órgãos e sistemas e morte durante a primeira etapa da doença. Os níveis de mediadores inflamatórios possuem uma relação com a gravidade da pancreatite. O TNF- α tem sido descrito como o agente iniciador da resposta inflamatória da pancreatite aguda. Estudos prévios usando a pentoxifilina para bloquear a produção de TNF- α têm demonstrado efeitos benéficos quando usada em modelos experimentais de sepse ou choque. A infecção pancreática é a mais grave complicação da pancreatite aguda com índices de mortalidade que podem chegar a 80%. Os mecanismos que determinam a ocorrência da infecção pancreática não são bem esclarecidos.

Objetivo: Determinar o efeito da inibição da produção de TNF- α na pancreatite aguda com a administração de pentoxifilina.

Métodos: Foi utilizado um modelo experimental de pancreatite aguda grave através da injeção intraductal de taurocolato de sódio a 2,5%. Cento e vinte e quatro ratos Wistar machos foram divididos em três grupos: Controle (animais submetidos ao procedimento cirúrgico sem a

administração de taurocolato de sódio), Pancreatite (animais submetidos à indução da pancreatite aguda) e Pentoxifilina (animais submetidos à indução da pancreatite aguda seguida da administração intraperitoneal de 25 mg/Kg de pentoxifilina). Foi realizada a dosagem sérica das interleucinas 6 e 10 e TNF- α duas horas após a indução da pancreatite. Foram analisadas a ocorrência de translocação bacteriana e a incidência de infecção pancreática, através de culturas realizadas 24 horas após a indução da pancreatite aguda e a mortalidade global. A ocorrência de infecção pancreática foi considerada como positiva quando a concentração de bactérias expressa em UFC/g foi maior que 10^5 .

Resultados: Quando comparado ao grupo Pancreatite, o grupo Pentoxifilina apresentou redução significativa da lesão histológica pancreática, dos níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α e da ocorrência de infecção pancreática ($p < 0,05$), tais alterações se associam a redução significativa da mortalidade no grupo Pentoxifilina.

Conclusão: A inibição da produção de TNF- α através da administração de pentoxifilina foi capaz de reduzir o processo inflamatório local e sistêmico, reduzir a translocação bacteriana e infecção pancreática e melhorar a sobrevida com redução dos índices de mortalidade desta grave doença.

Summary

MATHEUS, AS. Effect of inhibition of TNF- α production by pentoxifylline administration in experimental acute pancreatitis.

Acute pancreatitis (AP) is considered one of the typical conditions causing systemic inflammatory response (SIRS). Systemic complications are the most important contributors to multiple organ failure and death during the first stages of severe acute pancreatitis. Levels of pro-inflammatory cytokines increase during the course of AP, and these levels appear to be correlated with the severity of pancreatic inflammation. TNF- α may be an initiator of inflammatory process in AP. Previous studies using pentoxifylline to block TNF- α production have showed beneficial effects in experimental models of sepsis and shock. The gut is a target organ of the SIRS causing gut barrier dysfunction allowing bacteria and toxin translocation. Bacterial translocation has been implicated in the development of multiple organ failure and is one of the major causes of pancreatic infection in patients with pancreatic necrosis.

Aim: To determinate the effects of inhibition of TNF- α on the pancreatic and systemic inflammatory response, pancreatic infection, and mortality rate in necrotizing acute pancreatitis in rats.

Methods: An experimental model of severe AP by injection of 0.5ml of 2.5% sodium taurocholate into the pancreatic duct was utilized. A hundred

and twenty four male Wistar rats were divided in 3 groups: Sham (surgical procedure without AP induction), Pancreatitis (AP Induction), and Pentoxifylline (AP induction plus administration of 25 mg/kg pentoxifylline). Pancreatic inflammatory response was measured by histological studies and systemic inflammatory response was analyzed measuring the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, and TNF- α). Pancreatic infection was evaluated with bacterial cultures performed 24 h after the AP induction. The numbers of organisms were expressed as colony forming units (CFU) per gram. The occurrence of pancreatic infection was also analyzed and considered positive when the CFU/g was $> 10^5$. A parallel survival study was also performed.

Results: Inhibition of TNF- α by pentoxifylline shows beneficial effects in this experimental model. The Pentoxifylline group had a statistically significant reduction of histological damage in the pancreas, inflammatory cytokines levels (IL-6, IL-10, and TNF- α), and occurrence of pancreatic infection ($p < 0.05$). These changes were associated with a significant reduction of mortality rate.

Conclusions: Inhibition of TNF- α reduced local and systemic inflammatory response, reduced systemic complication as pancreatic infection, and decrease mortality rate in this model. Pentoxifylline may provide a useful therapy in the treatment of acute pancreatitis.

1 – INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) apresenta uma variação clínica bastante ampla, podendo apresentar desde um quadro leve com edema pancreático até quadros graves com extensa necrose pancreática, sendo a evolução e o quadro clínico relacionados com a intensidade e extensão da lesão pancreática e a resposta inflamatória a esta lesão.^{1,2} Com a finalidade de uniformizar a avaliação e o tratamento da pancreatite aguda foi criada em 1992 a classificação de Atlanta que determina duas formas de apresentação da doença: a pancreatite aguda leve que corresponde a 80 - 90% dos casos e se caracteriza por uma evolução benigna com mortalidade inferior a 1% e resolução espontânea na maioria dos casos e a pancreatite aguda grave com altos índices de complicações e mortalidade.²

Mesmo com os mais recentes avanços em procedimentos diagnósticos e de terapia intensiva,¹⁻⁶ a PA grave permanece como um grande desafio para as especialidades envolvidas em seu tratamento, estando muitas vezes associada à hospitalização prolongada, tratamento em unidade de terapia intensiva, suporte ventilatório e hemodinâmico e

elevada mortalidade. O índice de mortalidade na PA grave varia entre 10 e 15%, mesmo quando tratada em centros especializados e pode se tornar superior a 40% quando associada à infecção pancreática.^{2,3,5,7-10}

A resposta inflamatória na pancreatite aguda grave se caracteriza por um processo sistêmico desencadeado pela lesão do tecido pancreático, a qual se segue uma série de eventos com a liberação de mediadores inflamatórios, tais como, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas 1, 6 e 8 e fator ativador plaquetário (PAF).¹⁰⁻¹⁴ Estes mediadores são responsáveis pela ocorrência de insuficiência respiratória, instabilidade hemodinâmica, alteração da permeabilidade vascular e insuficiência renal, fenômenos que compõem a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e que têm como resultado final a insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (IMOS).¹⁵⁻¹⁸

A gravidade da doença não é determinada apenas pelo grau da lesão pancreática, mas também pela intensidade da resposta inflamatória.^{10,15,19-22} Desta forma o seu prognóstico está relacionado com a intensidade da resposta inflamatória.²³⁻²⁷

Níveis elevados de interleucina-6 (IL-6) e de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) estão diretamente ligados ao prognóstico, podendo a dosagem de tais mediadores ser utilizada para determinar a gravidade e prever a evolução da doença, reforçando, portanto, a relação entre a intensidade do processo inflamatório e a gravidade da doença.

^{22,26-29}

A lesão na pancreatite aguda se inicia na célula acinar, a lesão do ácino causada pela ativação enzimática intracelular é o fator responsável pela ativação do fator de transcrição NF-kappaB e posterior liberação de mediadores inflamatórios. O mecanismo exato causador da ativação enzimática e lesão intracelular ainda não foi esclarecido por completo, entretanto foi determinado que a lesão da célula acinar é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos circulantes e ativação da cascata inflamatória.^{18,27,28}

A ativação de células inflamatórias e a liberação de citocinas no tecido pancreático podem atuar como um novo fator de agressão local e intensificar a lesão pancreática, sendo desta forma a intensidade do processo inflamatório no tecido pancreático fator determinante na gravidade da pancreatite aguda.^{18,27,28,30}

Devido à importância do processo inflamatório na pancreatite aguda grandes esforços em pesquisa tem se concentrado, seja através de estudos clínicos ou experimentais, em esclarecer a resposta inflamatória e o papel dos principais mediadores envolvidos na fisiopatogênia da pancreatite aguda.^{19,22,24,26,27,28}

A IL-6 é considerada um dos mais importantes mediadores inflamatórios na pancreatite aguda, possui ação direta na ativação e proliferação de linfócitos T e tem sido considerada como fator essencial no desenvolvimento de disfunção da barreira intestinal.^{23,24,26,27} A concentração de IL-6 circulante aumenta significativamente após lesões

celulares tais como trauma, grandes queimaduras e pancreatite aguda grave.^{19,22}

O TNF- α tem sido muito estudado nos últimos anos por possuir papel fundamental na cascata de eventos inflamatórios que ocorrem durante a PA e a SRIS.²³⁻²⁵ O TNF- α produzido é rapidamente consumido pelos receptores celulares de superfície, é responsável pela ativação de neutrófilos, por alterações hemodinâmicas e da permeabilidade vascular e pelo estímulo à produção de novos mediadores inflamatórios, como a IL-6.³¹⁻³⁵

A IL-10 é considerada a principal interleucina com ação antiinflamatória, sendo responsável pela diminuição da produção de IL-1, IL-6 e IL-8 e pela redução dos níveis de TNF- α . Uma série de ensaios clínicos e experimentais tem demonstrado o efeito benéfico do uso de IL-10 como forma de prevenção e no tratamento da PA.^{19,26,36,37} A dosagem dos níveis séricos de IL-10 também pode ser utilizada como fator prognóstico na PA, uma vez que foi demonstrada uma relação direta entre a gravidade do processo inflamatório e a liberação de IL-10.³⁸

A dosagem dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios pode ser utilizada como fator prognóstico na PA, uma vez que foi demonstrada uma relação direta entre os níveis dos mediadores inflamatórios e a gravidade da doença. Imediatamente após o início da resposta inflamatória sistêmica desencadeada pela lesão do tecido pancreático é observado o aumento de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, PAF, TNF- α e PGE2, sendo seguido então da

liberação de mediadores antiinflamatórios como a IL-10 e a IL-11 com a finalidade de modular o processo inflamatório (Figura 1).

Desta forma o período inicial da PA se caracteriza por níveis elevados de TNF- α , IL-6 e IL-10, havendo uma relação direta entre os níveis dos mediadores e a gravidade da doença.^{24,26,27,28,33}

Figura 1. Resposta inflamatória mediada pelo TNF- α na pancreatite grave.

A utilização de drogas antiinflamatórias que possam interferir na seqüência de eventos desencadeados pela pancreatite aguda e diminuir a intensidade da resposta inflamatória e suas conseqüências como IMOS e translocação bacteriana mostrou-se como um importante

caminho para o tratamento da PA e prevenção de suas complicações.

22,28,32,36

A importância da reação inflamatória na PA e suas implicações foram descritas, tais como os efeitos deletérios de níveis elevados de TNF- α , IL-6 e outros mediadores inflamatórios na PA, sendo tais mediadores responsáveis pela alteração da perfusão pancreática, aumento da isquemia e necrose do tecido pancreático e piora do prognóstico.^{32,36}

Muitos são os fatores responsáveis pela evolução desfavorável na PA grave, dentre eles se destacam as complicações decorrentes da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e a infecção pancreática.^{5,6,8,23,27,28,30-32}

Duas fases são determinantes na evolução e no prognóstico da PA grave e estão relacionadas com os fenômenos descritos acima. A fase inicial, que corresponde aos primeiros 7 a 10 dias após a instalação do processo agudo, é caracterizada por eventos relacionados à SRIS, tais como instabilidade hemodinâmica e insuficiência respiratória, sendo a mortalidade diretamente relacionada aos eventos inflamatórios. Posteriormente, surgem as complicações sépticas que são responsáveis por significativa piora no prognóstico e caracterizam a segunda fase na evolução da PA grave.^{2,5,9,19,28,33-35}

A infecção pancreática é uma complicação grave, presente em 8 a 12% dos casos de PA, sendo que a incidência de infecção se eleva para 30 a 40% dos casos de PA associados à necrose pancreática.

A infecção pancreática é responsável por mais de 80% das mortes em pacientes com PA.^{2,3,5-8,17,36-38} O diagnóstico precoce, a prevenção e o tratamento da infecção pancreática na forma grave da doença são grandes desafios, que visam à diminuição dos elevados índices de morbidade e mortalidade.^{1,3-5,9,39,40}

A translocação bacteriana tem sido considerada como o principal evento responsável pelo desenvolvimento de infecção do tecido pancreático na PA grave.^{3,36,40-44} Desta forma, o controle da translocação bacteriana está diretamente relacionado com a diminuição da incidência de infecção pancreática, podendo ser um importante fator de melhora do prognóstico.^{4,40,43,44}

Em trabalhos anteriores, foi observada a presença de translocação bacteriana em modelos experimentais de PA, sendo a translocação proporcional à gravidade das lesões histológicas do pâncreas e a resposta inflamatória.^{43,44}

Os mecanismos que determinam a translocação bacteriana ainda não foram esclarecidos por completo.^{38,43,45-48} Vários fatores como o desequilíbrio da população bacteriana intra-luminal, o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e a diminuição das defesas imunológicas têm sido atribuídos como responsáveis pela passagem de bactérias através da parede intestinal.^{39,43,46,48-53}

A capacidade do intestino em proteger o organismo contra fatores intra-luminais é conhecida como barreira intestinal.^{47,53-55} Tal barreira é constituída por diversos fatores que compreendem a camada

de muco epitelial, a borda em escova das células intestinais, as membranas celulares apicais e basolaterais, as junções intercelulares, a matriz intersticial, o endotélio dos vasos capilares e linfáticos, o sistema imune, os linfonodos mesentéricos e o sistema reticuloendotelial hepático e esplênico. ^{48,56-58}

Apesar dos estudos que avaliaram o funcionamento da barreira intestinal, o mecanismo da translocação bacteriana permanece pouco esclarecido quando se refere à via de disseminação bacteriana. São várias as hipóteses a respeito do possível caminho percorrido pelas bactérias desde a luz intestinal até o sítio infeccioso, sendo as vias hematogênica, linfática e transmural as possibilidades mais aceitas. ^{49-53,56}

A possibilidade de interferir no processo inflamatório da pancreatite aguda grave e reduzir a intensidade dos eventos associados como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, IMOS, translocação bacteriana e infecção pancreática surgiu como uma alternativa terapêutica e motivou a realização de uma série de ensaios experimentais utilizando drogas capazes de bloquear ou reduzir a produção dos mais diversos mediadores inflamatórios envolvidos na pancreatite aguda.

A importância do TNF- α como fator iniciador da cascata inflamatória, descrita em trabalhos anteriores, ^{19,22} sinalizou para uma via com possíveis resultados positivos no tratamento da pancreatite aguda grave e motivou em nosso meio a busca por uma droga com ação efetiva sobre o TNF- α , droga esta com boa aplicabilidade clínica e baixo custo.

A pentoxifilina (1-[5-oxohexil]-3,7-dimetilxantina), um derivado da metilxantina, foi inicialmente utilizada para o tratamento de doenças vasculares periféricas por melhorar o fluxo microcirculatório, efeito que se deve à alteração da hemorreologia das células brancas e vermelhas, permitindo desta forma maior deformidade dessas células e conseqüente diminuição da viscosidade sangüínea e da ocorrência de microtromboses.⁶⁸⁻⁷⁰

Devido a estas ações a pentoxifilina vem sendo utilizada nas últimas duas décadas no tratamento da doença arterial oclusiva crônica. Além dos efeitos na hemorreologia das células brancas e vermelhas, recentemente foi descrito importante efeito antiinflamatório da pentoxifilina. A administração de pentoxifilina resulta em uma série de efeitos benéficos no tratamento do choque hemorrágico e de grandes queimados, tais como diminuição da translocação bacteriana, de pulmão de choque e melhora da sobrevida.⁶⁹⁻⁷²

Estudos demonstraram que a pentoxifilina não possui apenas ação na viscosidade e no fluxo sanguíneo, mas também possui importantes propriedades imunológicas, como diminuir a produção de citocinas pelos monócitos.⁷³ Evidências sugerem que a transcrição de m-RNA para produção de TNF- α nos monócitos seja bloqueada pela pentoxifilina.⁷³

A transcrição de m-RNA e conseqüente produção de TNF- α são dependentes da ativação do NF- κ B, molécula de transcrição responsável por extrair do DNA à informação genética necessária para

produção de mediadores inflamatórios, tais como o TNF- α (Figura 2). O fator de transcrição NF- κ B desempenha desta forma papel central no controle da resposta imune e inflamatória, regulando a transcrição dos mediadores inflamatórios.⁷³

Figura 2. Processo de ativação do NF-κB para transcrição do material genético e produção de TNF-α.

A pentoxifilina bloqueia a ativação do NF- κ B, impedindo que o processo de transcrição ocorra, bloqueando, desta forma, a produção de TNF- α . O tratamento com pentoxifilina promove restauração da atividade e da função hepatocelular, diminui a ocorrência de lesão pulmonar e melhora o fluxo sanguíneo microvascular, atuando também na microcirculação intestinal melhorando a perfusão intestinal. Outra importante ação da pentoxifilina é a redução da produção de citocinas. ⁷⁴⁻

76

Drogas que diminuam a resposta inflamatória local e sistêmica na pancreatite aguda grave e, por conseguinte, a ocorrência de insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas e a infecção associada aos quadros de pancreatite aguda e suas complicações podem ser a chave de uma modalidade terapêutica que permita melhorar o prognóstico desta doença grave, reduzindo assim seus altos índices de morbidade e mortalidade.

2 - OBJETIVOS

Estudar o efeito da inibição da produção de TNF- α por meio da administração de pentoxifilina na pancreatite aguda grave experimental, sobre a liberação de mediadores inflamatórios, a ocorrência de translocação bacteriana, infecção pancreática e mortalidade.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica – LIM37 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 – Aspectos éticos

Previamente ao início da execução deste projeto, o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, HC-FMUSP). Respeitaram-se as normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação, segundo o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 1996.*

3.2 - Animais de experimentação

Foram utilizados 124 ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 235-250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Laboratório de Investigação Médica – LIM 37, em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada (20-22°C) e com alimentação padrão e água *ad libitum*.

3.3 – Delineamento experimental

Foram estudados três grupos assim distribuídos (Figura 3):

Grupo I - Controle: constituído por 38 animais que foram submetidos à realização do procedimento cirúrgico sem a indução de PA seguido da administração de solução salina estéril 1,25 ml/Kg por via intraperitoneal.

Grupo II – Pancreatite (PA): constituído por 43 animais que foram submetidos à indução de PA e posterior administração de solução salina estéril 1,25 ml/Kg por via intraperitoneal.

Grupo III – Pentoxifilina (PTX): constituído de 43 animais, que foram submetidos à indução de PA e posterior administração de pentoxifilina 25mg/kg (1,25 ml/Kg) por via intraperitoneal.

Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental.

Os grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina foram submetidos à dosagem das interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

A avaliação da translocação bacteriana foi realizada em todos os grupos através da coleta de material (pâncreas, linfonodos mesentéricos, fígado, sangue e líquido peritoneal) 24 horas após a indução da PA.

Para avaliação da mortalidade 20 ratos de cada grupo foram observados por sete dias e determinado o índice de mortalidade neste período.

3.4 - Indução da pancreatite aguda

A pancreatite aguda foi induzida através de injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio a 2,5% (Taurocholic acid, sodium salt, Sigma-Chemical Company™, St. Louis, U.S.A.) no ducto pancreático, na dose de 0,5 ml/rato com tempo médio de infusão de 120 segundos.^{77,78}

O procedimento obedeceu à seqüência abaixo descrita: anestesia dos animais com administração de cloridrato de cetamina 0,2 ml/100g de peso, através de injeção intramuscular, tricotomia abdominal, anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo, colocação de campos estéreis.

Abertura da cavidade através de incisão mediana infra-xifoídia de aproximadamente 1,0 cm, exteriorização do arco duodenal e pâncreas, identificação e oclusão do ducto biliar ao nível do hilo hepático com pinça tipo *bulldog*, punção da porção contra-mesentérica do duodeno

com agulha 25x7, cateterização do ducto biliar com cateter de polietileno e posterior infusão retrógrada da solução de taurocolato de sódio a 2,5%, fechamento da punção duodenal com ponto em x com *nylon 6-0* e fechamento por planos da parede abdominal com *nylon 5-0*.

A pancreatite aguda grave induzida pelo método utilizado no presente estudo caracteriza-se macroscopicamente pela presença de inflamação, necrose gordurosa, hemorragia e edema. Imediatamente após a infusão de taurocolato de sódio eram observados sinais macroscópicos de inflamação do tecido pancreático como edema, eritema e hemorragia (Figuras 4 e 5).

Todo o procedimento de indução da pancreatite foi realizado sob rigorosos critérios de assepsia e anti-sepsia.

3.5 - Administração de pentoxifilina e solução salina

As substâncias foram administradas por via intraperitoneal, respeitando os mais rigorosos critérios de assepsia e anti-sepsia para manipulação e administração.⁷⁹

Pentoxifilina

Foi administrada pentoxifilina 25mg/kg (1,25 ml/Kg) por via intraperitoneal logo após a indução da PA e doses subsequentes foram administradas 12, 24, 36 e 48 horas após a indução da PA.⁷⁹

Solução Salina

Foi administrada solução salina estéril 1,25 ml/Kg por via intraperitoneal logo após a indução da PA e doses subseqüentes foram administradas 12, 24, 36 e 48 horas após a indução da PA nos grupos Controle e Pancreatite.

Figura 4. Aspecto do arco duodenal e do pâncreas antes da indução da pancreatite. Observa-se o ducto biliar cateterizado e o arco duodenal reparado por nylon 6-0.

Figura 5. Aspecto do arco duodenal e do pâncreas após a indução da pancreatite. Presença de hiperemia e edema do tecido pancreático. O ducto biliar cateterizado e ocluído junto ao hilo hepático e o arco duodenal reparado.

3.6 – Dosagem de mediadores inflamatórios

Foram coletadas amostras de sangue 2 horas após a indução da PA para dosagem dos seguintes mediadores inflamatórios: interleucina-6 (IL-6), e interleucina-10 (IL-10). Foram coletadas amostras de líquido ascítico 1 hora após a indução da PA para dosagem de fator de necrose tumoral α (TNF- α).

As amostras (sangue e líquido ascítico) foram colhidas e imediatamente centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes estocados a -20°C. Os resultados foram expressos em pg/ml.

A determinação quantitativa dos mediadores inflamatórios foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) através da utilização dos kits da *Biosource International Cytoscreen™* para dosagem de IL-6, IL-10 e TNF- α .

3.7- Estudo microbiológico

3.7.1 - Coleta de material para análise microbiológica

Após período de 24 horas da indução da PA os ratos foram submetidos à anestesia com cloridrato de cetamina 0,2 ml/100g de peso,

anti-sepsia, colocação de campos estéreis e abertura da cavidade torácica e abdominal através de incisão ampla. Foi coletado material para o estudo bacteriológico através de lavado peritoneal realizado com 5 ml soro fisiológico 0,9% para cultura da cavidade peritoneal, punção cardíaca e retirada de 3 ml de sangue para realização de hemocultura e a extração cirúrgica de fragmentos de pâncreas, linfonodos mesentéricos e fígado para cultura dos respectivos tecidos.

Todo o procedimento de coleta foi realizado obedecendo a rigorosos critérios de assepsia e anti-sepsia.

3.7.2 - Análise microbiológica

Foi realizada com o objetivo de se avaliar a translocação bacteriana, a determinação quantitativa da população bacteriana, a incidência de infecção pancreática e o estudo microbiológico qualitativo.

As amostras foram preparadas de acordo com técnica descrita em trabalhos anteriores realizados neste laboratório, ^{43,44} semeadas em meios de cultura e incubadas em estufas para crescimento de bactérias aeróbias. ⁸⁰⁻⁸²

As hemoculturas e culturas da cavidade peritoneal foram realizadas por técnica automatizada, utilizando meio aeróbio (*Bactec*® série 9240 frasco pediátrico – Becton Dickinson™) com tempo de incubação de 5 dias e posterior realização de semeadura em placa de

Agar-sangue e MacConkey quando positivas, para identificação dos microorganismos.

As culturas de pâncreas, linfonodos mesentéricos e fígado foram realizadas após pesagem e homogeneização dos tecidos em 5 ml de solução de BHI e posterior diluição 1:10 com alíquotas de 0,5 ml do homogenato inicial em tubos contendo 4,5 ml de BHI. Foram semeados 0,1 ml da diluição em placas de Agar-sangue e MacConkey.

Para a determinação quantitativa (população bacteriana) dos órgãos submetidos à cultura foi utilizada técnica descrita no *Clinical Microbiology Procedures* e expressa em unidades formadoras de colônias (UFC/g tecido), sendo utilizada a seguinte fórmula: ⁸⁰

$$\text{UFC/g de tecido} = \frac{n \times 50 \times D}{W}$$

n = número de colônias na placa

50 = fator de compensação

D = recíproco da diluição

W = peso do tecido

Na identificação qualitativa das colônias bacterianas foi utilizada técnica microbiológica padrão de acordo com o *Clinical Manual of Microbiology* e utilização do sistema automatizado *Vitek System*®. ⁸⁰⁻⁸²

Para a realização da análise da translocação bacteriana nos diferentes tecidos foi considerada a presença de qualquer colônia nas placas semeadas como positivo para a ocorrência de translocação bacteriana.

As culturas dos órgãos sólidos (pâncreas, linfonodos e fígado) foram posteriormente submetidas à comparação quantitativa das bactérias encontradas em cada um dos respectivos grupos estudados, através da análise do número de microorganismo expresso em UFC/g.

A infecção do tecido pancreático foi considerada positiva quando a população bacteriana encontrada no tecido pancreático fosse superior a 10^5 UFC/g.^{81,82}

Toda a análise microbiológica foi realizada na Seção de Microbiologia - Divisão de Laboratório Central – ICHC da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.8 - Análise Histológica

Após a observação da cavidade peritoneal e coleta de material para análise microbiológica, foram retirados fragmentos do tecido pancreático. Os fragmentos foram fixados em aldeído fórmico a 10% imediatamente após a coleta e encaminhados para o laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram incluídos em

parafina, cortados em espessura de 5 micrômetros e corados através da técnica de hematoxilina-eosina e observados à microscopia ótica.

A avaliação do tecido pancreático foi realizada através da utilização da classificação do processo inflamatório pancreático proposto por Schmidt et al ⁸³, analisando as seguintes variáveis: edema, necrose acinar, hemorragia, necrose gordurosa, inflamação e infiltrado perivascular (Tabela 1). A graduação do processo inflamatório foi realizada através da atribuição de pontos para cada uma das variáveis descritas e posterior análise comparativa entre os diferentes grupos estudados.

A análise histológica foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por patologista especializado em histologia pancreática, sendo que o mesmo não possuía conhecimento dos grupos estudados.

3.9 – Estudo da mortalidade

Foram utilizados 20 ratos de cada grupo, distribuídos nos grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina, que receberam a administração de solução salina ou pentoxifilina realizadas nos tempos 0hs, 12hs, 24hs, 36hs e 48hs após a indução de PA, de acordo com delineamento experimental proposto. Os animais foram observados por 7 dias.

Tabela 1. Classificação do processo inflamatório do tecido pancreático proposta por Schmidt *et al.*⁸³

EDEMA	Pontos
Ausente	0
expansão focal dos septos interlobares	0,5
Expansão difusa dos septos interlobares	1
1+ expansão focal dos septos interlobulares	1,5
1+ expansão difusa dos septos interlobulares	2
2+ expansão focal dos septos interacinares	2,5
2+ expansão difusa dos septos interacinares	3
3+ expansão focal dos espaços intercelulares	3,5
3+ expansão difusa dos espaços intercelulares	4
NECROSE ACINAR	
Ausente	0
Ocorrência focal de 1-4 células necróticas/CGA	0,5
Ocorrência difusa de 1-4 células necróticas/CGA	1
1+ ocorrência focal de 5-10 células necróticas/CGA	1,5
Ocorrência difusa de 5-10 células necróticas /CGA	2
2+ ocorrência focal de 11-16 células necróticas /CGA	2,5
Ocorrência difusa de 11-16 células necróticas /CGA	3
3+ ocorrência focal de + de 16 células necróticas /CGA	3,5
> de 16 células necróticas /CGA	4
HEMORRAGIA	
Ausente	0
1 foco	0,5
2 focos	1
3 focos	1,5
4 focos	2
5 focos	2,5
6 focos	3
7 focos	3,5
8 ou mais focos	4
NECROSE GORDUROSA	
Ausente	0
1 foco	0,5
2 focos	1
3 focos	1,5
4 focos	2
5 focos	2,5
6 focos	3
7 focos	3,5
8 ou mais focos	4
INFLAMAÇÃO E INFILTRADO PERIVASCULAR	
0-1 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	0
2-5 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	0,5
6-10 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	1
11-15 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	1,5
16-20 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	2
21-25 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	2,5
26-30 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	3
>30 leucócitos/CGA ou microabscessos focais	3,5
>35 leucócitos/CGA ou microabscessos confluentes	4

3.10 – Análise estatística

Os resultados das dosagens dos mediadores inflamatórios foram analisados através do teste de ANOVA. Quando houve diferença estatística foi aplicado o teste de Tukey. ^{84,85}

A ocorrência de translocação bacteriana foi analisada nas diversas culturas dos seguintes tecidos: pâncreas, linfonodos mesentéricos, fígado, sangue e cavidade peritoneal, através da comparação entre a presença ou ausência de culturas positivas em cada tecido utilizando o teste exato de Fisher. ^{84,85}

A população bacteriana de cada tecido com cultura positiva foi avaliada de forma comparativa utilizando o teste de Mann-Whitney. ^{84,85}

A infecção foi considerada positiva quando a população bacteriana encontrada nas culturas positivas foi maior que 10^5 UFC/g de tecido. Para análise dos dados referentes à ocorrência de infecção foi aplicado o teste exato de Fisher. ^{84,85}

Os escores histológicos do pâncreas foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis. Quando houve diferença estatística foi aplicado o teste de Dunn para análise dois a dois. ^{84,85}

A mortalidade foi analisada através das curvas de Kaplan-Meier e comparadas utilizando os testes Log-rank. ^{84,85}

O nível de significância considerado foi de 0,05 para todos os resultados, sendo utilizado o programa estatístico *Graphpad Prism*® versão 4.0.

4 – RESULTADOS

4.1 – *Dosagem de mediadores inflamatórios*

IL-6 e IL-10

Houve aumento significativo dos níveis séricos de IL-6 e IL-10 nos animais do grupo Pancreatite quando comparado aos animais do grupo Controle. Os animais que receberam a administração de pentoxifilina apresentaram redução significativa dos níveis de IL-6 e IL-10 quando comparados ao grupo Pancreatite (Gráfico 1e 2 e Tabela 2).

Gráfico 1. Valores individuais de IL-6 nos grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina.

Controle x PA $p < 0,005$ (ANOVA)

* PA x PTX $p < 0,005$ (ANOVA)

Controle x PTX $p > 0,05$ (ANOVA)

Gráfico 2. Valores individuais de IL-10 nos grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina.

Controle x PA $p < 0,05$ (ANOVA)

* PA x PTX $p < 0,05$ (ANOVA)

Controle x PTX $p > 0,05$ (ANOVA)

TNF- α

Observamos aumento dos níveis de TNF- α no líquido ascítico nos animais do grupo Pancreatite. Houve redução estatisticamente significativa do nível de TNF- α no grupo Pentoxifilina quando comparado ao grupo Pancreatite (Gráfico 3 Tabela 2).

Gráfico 3. Valores individuais de TNF- α no líquido ascítico nos grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina.

Controle x PA $p < 0,05$ (ANOVA)
 * PA x PTX $p < 0,05$ (ANOVA)
 Controle x PTX $p > 0,05$ (ANOVA)

Tabela 2. Mediadores inflamatórios.

	IL-6	IL-10	TNF-α
Controle	0 (n=8)	0 (n=8)	0 (n=8)
PA	116 $\pm$ 21 * (n=12)	186 $\pm$ 23 * (n=13)	75 $\pm$ 14* (n=12)
PTX	36 $\pm$ 5 (n=12)	86 $\pm$ 17 (n=13)	35 $\pm$ 9 (n=12)

Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-6 e IL-10 no soro e TNF- α no líquido ascítico expressos em pg/ml. * $p < 0,05$ (ANOVA)

Os resultados individuais por grupo da determinação dos mediadores inflamatórios estão descritos nos anexos 1 e 2.

4.2 – Estudo microbiológico

4.2.1 – Translocação bacteriana

Os animais do grupo Controle não apresentaram crescimento bacteriano em todos os tecidos estudados. O grupo Pentoxifilina apresentou significativa redução do número de culturas positivas (ocorrência de translocação bacteriana) no tecido pancreático quando comparado ao grupo Pancreatite, não havendo diferença significativa com relação ao grupo Controle. (Tabela 3).

Tabela 3. Ocorrência de translocação bacteriana.

	Pâncreas	Linfonodos	Fígado	Sangue	Cavidade peritoneal
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
PA	9/10*	8/10	5/10	7/10	9/10
PTX	2/10	4/10	1/10	3/10	5/10

Dados representam a ocorrência de translocação bacteriana nos diversos tecidos acima descritos.

Pâncreas: Controle x PA $p < 0,05$ (Teste exato de Fisher)

PA x PTX $p < 0,05$ (Teste exato de Fisher)

Controle x PTX $p > 0,05$ (Teste exato de Fisher)

4.2.2 – População bacteriana

Observamos redução estatisticamente significativa da população bacteriana expressa em UFC/g do grupo Pentoxifilina no tecido pancreático quando comparado ao grupo Pancreatite.

Os demais tecidos estudados do grupo Pentoxifilina não apresentaram redução estatisticamente significativa na população bacteriana quando comparados ao grupo Pancreatite (Tabela 4).

Tabela 4. População bacteriana.

	Pâncreas	Linfonodos Mesentéricos	Fígado
PA	1,50 ± 1,31 * (n=10)	0,34 ± 0,42 (n=10)	0,20 ± 0,40 (n=10)
PTX	0,24 ± 0,56 (n=10)	0,06 ± 0,16 (n=10)	0,02 ± 0,05 (n=10)

Valores das médias ± desvio padrão correspondentes à população bacteriana expressa em UFC/g 10⁵ no pâncreas, linfonodos mesentéricos e fígado dos grupos Pancreatite e Pentoxifilina.

PA x PTX: Pâncreas p < 0,05; Linfonodos p > 0,05; Fígado p > 0,05 (Teste de Mann-Whitney)

Os resultados individuais estão descritos no anexo 3.

4.2.3 – Infecção pancreática

Não observamos ocorrência de infecção pancreática nos animais do grupo Controle. Os animais do grupo Pancreatite apresentaram um aumento estatisticamente significativo na incidência de infecção pancreática quando comparado ao grupo Controle (Gráfico 4).

O grupo Pentoxifilina apresentou redução estatisticamente significativa da ocorrência de infecção pancreática quando comparado ao grupo Pancreatite (Tabela 5).

Gráfico 4. Valores percentuais da ocorrência de infecção pancreática.

Controle x PA $p < 0,05$ (Teste exato de Fisher)

* PA x PTX $p < 0,05$ (Teste exato de Fisher)

Controle x PTX $p > 0,05$ (Teste exato de Fisher).

Tabela 5. Infecção pancreática.

Grupos	Infecção pancreática
Controle	0/10
Pancreatite	6/10 *
Pentoxifilina	1/10

Controle x PA $p < 0,05$ (Teste exato de Fisher)

PA x PTX $p < 0,05$ (Teste exato de Fisher)

Controle x PTX $p > 0,05$ (Teste exato de Fisher).

4.2.4 – Estudo microbiológico qualitativo

O mesmo padrão de crescimento bacteriano foi observado nos animais submetidos à PA com predomínio de bactérias Gram negativas nas culturas de todos os tecidos. A administração de pentoxifilina não alterou a flora bacteriana encontrada nas culturas deste grupo quando comparado com o grupo pancreatite.

Os gráficos 5 e 6 representam as principais bactérias identificadas no pâncreas nos grupo Pancreatite e Pentoxifilina respectivamente.

Gráfico 5. Distribuição percentual das bactérias identificadas no grupo Pancreatite.

■ *E. coli* ■ *E. fecalis* ■ *S. viridans* ■ *S. epidermidis* ■ *S. aureus* ■ *S. Coag. negativa* ■ outros

Gráfico 6. Distribuição percentual das bactérias identificadas no grupo Pentoxifilina.

4.3 – Avaliação histológica

Todos os animais do grupo Pancreatite apresentaram lesões pancreáticas características de pancreatite aguda grave: edema, necrose acinar, hemorragia, necrose gordurosa, inflamação e infiltrado perivascular (Figura 6).

Figura 6. Aspecto microscópico de fragmento de pâncreas de rato com PA (Grupo Pancreatite). Coloração: HE Aumento 40x. Presença de acentuado edema lobular (1), necrose (2), hemorragia (3) e infiltrado inflamatório (4).

Houve redução significativa do escore médio para avaliação histológica da pancreatite aguda nos animais que receberam pentoxifilina quando comparados ao grupo Pancreatite (Gráfico 7).

Gráfico 7. Representação dos valores do escore histológico, contendo os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo.

* PA vs. PTX $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis)
Controle vs. PTX $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis)
Controle vs. PA $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis)

Os resultados individuais estão descritos no anexo 4.

4.4 - Mortalidade

Não houve mortalidade no grupo Controle. O grupo Pancreatite apresentou mortalidade de 35% enquanto o grupo Pentoxifilina apresentou 10% de mortalidade.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevida dos animais que receberam pentoxifilina, quando comparados aos animais do grupo Pancreatite (Gráfico 8).

Gráfico 8. Comparação entre as curvas de sobrevida.

* PA vs. PTX $p > 0,05$ (Teste de Log-Rank)

Controle vs. PTX $p > 0,05$ (Teste de Log-Rank)

Controle vs. PA $p < 0,05$ (Teste de Log-Rank)

5 - DISCUSSÃO

A administração de pentoxifilina nas condições propostas por este estudo experimental provocou alterações significativas nos animais portadores de pancreatite grave as quais devem ser ressaltadas. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado o efeito da administração de pentoxifilina na redução da ocorrência de infecção pancreática na pancreatite aguda experimental.

Os eventos inflamação sistêmica, IMOS, falência da barreira mucosa e translocação bacteriana são atualmente aceitos como responsáveis pela ocorrência de quadros infecciosos e sepse em situações clínicas como a pancreatite aguda grave, choque hemorrágico e grandes queimados, demonstrando a importância do controle do evento inflamatório na prevenção de complicações infecciosas. ^{8,9,13,26,28,33}

O processo inflamatório presente na pancreatite aguda tem sido profundamente estudado e sua intensidade se relaciona com o grau de lesão do tecido pancreático. Dessa forma, acredita-se que a gravidade e o prognóstico da pancreatite aguda estejam relacionados com os níveis

de mediadores inflamatórios circulantes, tais como IL-6, IL-8, IL-10, PAF e TNF- α .^{22,26,28,29,31,32}

Os níveis elevados de IL-6 e de IL-10 estão diretamente ligados ao prognóstico da PA, havendo uma relação direta entre os níveis séricos destas interleucinas e a gravidade da doença. Alguns autores defendem a utilização da dosagem sérica de tais mediadores como indicadores de prognóstico na pancreatite aguda.^{22,26-28,31,32} Esta proposta se apóia no fato da intensidade da resposta inflamatória ser traduzida pelos altos níveis de citocinas circulantes, sendo a intensidade da resposta inflamatória fator determinante para o desenvolvimento de eventos como IMOS, translocação bacteriana e indiretamente a ocorrência de infecção pancreática.²⁶⁻²⁸

No presente estudo a administração de pentoxifilina resultou na diminuição dos níveis séricos de IL-6 e IL-10, como também na dosagem de TNF- α , demonstrando um efetivo bloqueio do processo inflamatório sistêmico na PA grave. A redução da produção de TNF- α e consequentemente diminuição da intensidade da resposta inflamatória sistêmica ao evento pancreatite aguda, apóia a hipótese de ser o TNF- α o principal mediador inflamatório na pancreatite aguda.^{82,83}

Nos últimos anos houve um grande esforço na tentativa de esclarecer as causas que determinam a infecção do tecido pancreático necrótico durante a pancreatite aguda grave. A maioria dos estudos realizados demonstrou ser a translocação bacteriana o fator responsável pela contaminação do tecido pancreático necrótico e conseqüente

processo infeccioso, trazendo assim conseqüências devastadoras para a evolução e o prognóstico da doença.^{3,4,36,39-45,56}

Para a realização do estudo da translocação bacteriana se faz necessária à utilização de métodos bastante criteriosos e com grande rigor técnico, fundamentais para o sucesso do trabalho. Para tanto, foi utilizado nesta pesquisa método consagrado pela literatura e anteriormente utilizado em nosso laboratório conforme referido no capítulo material e métodos.^{33,34}

A ausência de crescimento bacteriano no grupo Controle demonstrou a eficácia do método utilizado. Todas as culturas realizadas nos animais do grupo Controle foram negativas. Entretanto, o grupo Pancreatite apresentou culturas positivas nos tecidos analisados o que sugere a relação entre a pancreatite aguda e a ocorrência de translocação bacteriana.

Houve crescimento bacteriano em todos os tecidos analisados do grupo Pancreatite, com ênfase ao pâncreas, linfonodos mesentéricos, sangue e cavidade peritoneal. Tais resultados vêm de encontro às hipóteses que indicam as possíveis vias de disseminação das bactérias durante a translocação bacteriana: via linfática – linfonodos mesentéricos, via hematogênica – corrente sanguínea e via transmural - cavidade peritoneal.^{41,43,44} As culturas positivas foram significativamente maiores nos tecidos relacionados com tais vias de disseminação.

Há evidências de que a translocação bacteriana seja um processo contínuo e possua três níveis diversos.^{44,45} O primeiro nível se

caracteriza pela ocorrência de translocação de forma contínua em indivíduos sadios, sendo que nesta situação os microorganismos são contidos e eliminados pela barreira mucosa gastrointestinal, não permitindo assim a ocorrência de qualquer repercussão clínica. No segundo nível, as bactérias se disseminam além da barreira mucosa e dos linfonodos mesentéricos atingindo órgãos distantes como o fígado, baço ou pâncreas. Alterações no funcionamento e equilíbrio da barreira mucosa e do sistema imune são os responsáveis por este fenômeno. O terceiro nível se caracteriza pelo acometimento sistêmico e pela ocorrência de infecções e quadros sépticos, nível de translocação observado na pancreatite aguda grave.^{43,45}

A administração de pentoxifilina foi capaz de reduzir a translocação bacteriana, a população de bactérias encontrada no pâncreas e a ocorrência de infecção pancreática. Além disso, os dados obtidos neste trabalho após o uso de pentoxifilina, sugerem como verdadeira a hipótese de que a translocação bacteriana seja o evento responsável pela infecção pancreática, uma vez que foi observada relação direta entre a frequência e quantidade de bactérias translocadas com a ocorrência de infecção pancreática.^{70,75-80}

A redução da população bacteriana no tecido pancreático e da ocorrência de infecção pode ser justificada pela redução do processo inflamatório sistêmico demonstrado pela diminuição dos níveis de IL-6 e TNF- α , uma vez que existe uma importante ação dos mediadores

inflamatórios IL-6 e TNF- α na disfunção da barreira mucosa permitindo a ocorrência da translocação bacteriana.^{31-33,73}

A disfunção da barreira intestinal está associada à SRIS e foi descrito que níveis elevados de TNF- α e IL-6 causam alteração da circulação mesentérica e da integridade da barreira mucosa intestinal. Este efeito se deve à ação direta de tais mediadores inflamatórios levando a depressão miocárdica, baixo fluxo mesentérico e consequente isquemia intestinal, favorecendo assim a translocação bacteriana.^{13,28} A disfunção da barreira intestinal é considerada como parte da insuficiência de órgãos e sistemas, assim como a insuficiência renal, insuficiência respiratória e insuficiência cardiovascular, associadas à PA grave.^{13,29,33} No presente estudo a relação entre o nível de TNF- α e a incidência de infecção pancreática reforça a importância deste mediador inflamatório na PA grave e a relação direta entre processo inflamatório, translocação bacteriana e infecção.

As bactérias isoladas no pâncreas mantiveram o mesmo padrão quando comparadas com trabalhos anteriores, com predomínio de bactérias Gram negativas de origem intestinal.^{33,34} O isolamento de bactérias de origem intestinal nos tecidos estudados reforça a hipótese de estar na translocação bacteriana a origem das bactérias responsáveis pela infecção pancreática.

No presente estudo, a administração de pentoxifilina foi capaz de reduzir a incidência de infecção pancreática sem no entanto

alterar a flora bacteriana observada nas culturas positivas, prevenindo dessa forma as complicações observadas após o uso de antibióticos.

Analisando os aspectos histológicos observou-se que o grau de inflamação presente no tecido pancreático foi reduzido com a administração de pentoxifilina, sendo a pentoxifilina capaz de interferir no grau de inflamação e lesão do tecido pancreático. A resposta inflamatória inicial no tecido pancreático seria responsável por agravar a lesão tecidual, contribuindo para o agravamento da doença e o surgimento de alterações ao nível sistêmico, desta forma o controle da resposta inflamatória no tecido pancreático seria capaz de reduzir a gravidade da resposta sistêmica.^{18,19}

A redução da lesão pancreática observada após a administração de pentoxifilina provavelmente se deva não só à redução da resposta inflamatória local como também à redução da resposta inflamatória sistêmica e suas conseqüências. O papel da infecção pancreática no processo inflamatório local não pode ser avaliado no presente trabalho, sendo objeto de investigação futura.

A pancreatite aguda grave com necrose e infecção pancreática possui elevados índices de mortalidade, quando associada à insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (IMOS) podendo o índice de mortalidade se aproximar de 100% em algumas situações.^{1,2,4,5,6} A alta taxa de mortalidade, nestas situações se deve ao conjunto de fenômenos causados pela intensa resposta inflamatória sistêmica presente nos quadros de pancreatite aguda e aos fenômenos decorrentes de um

quadro infeccioso grave, tais como a liberação de mediadores inflamatórios e toxinas.^{5,6,8,23,27,28,31-35}

A administração de pentoxifilina foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade dos animais submetidos a PA experimental. A redução do processo inflamatório local e sistêmico e a diminuição da ocorrência de infecção pancreática obtidas com o uso da pentoxifilina são os fatores responsáveis por tal resultado, uma vez que os altos índices de mortalidade na PA grave estão relacionados com a ocorrência de SRIS e infecção pancreática.⁸⁶

Os resultados deste estudo apontam para uma nova alternativa terapêutica permitindo desta forma reduzir a resposta inflamatória e a ocorrência de infecção pancreática na pancreatite aguda grave possibilitando a redução da mortalidade. Entretanto ensaios clínicos devem ser realizados para confirmar os resultados observados neste estudo experimental.

6 – CONCLUSÕES

O presente estudo realizado nas condições descritas permitiu a seguinte conclusão:

A inibição da produção de TNF- α por meio da administração de pentoxifilina na pancreatite aguda experimental resultou na diminuição do processo inflamatório pancreático, na redução da produção de IL-6 e IL-10, na diminuição da translocação bacteriana e infecção pancreática e na redução da mortalidade.

7 – ANEXOS

ANEXO 1-Valores individuais das dosagens de IL-6 e IL-10 no soro dos animais dos grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina.

GRUPO CONTROLE

Ratos	<u>IL-6</u>	<u>IL-10</u>
	pg/ml	pg/ml
Rato 1	0	0
Rato 2	0	0
Rato 3	0	0
Rato 4	0	0
Rato 5	0	0
Rato 6	0	0
Rato 7	0	0
Rato 8	0	0
n=8		
X=	0	0
S=	0	0
EPM=		

GRUPO PANCREATITE

Ratos	<u>IL-6</u>	<u>IL-10</u>
	pg/ml	pg/ml
Rato 1	132	298
Rato 2	80	233
Rato 3	22	242
Rato 4	134	159
Rato 5	94	347
Rato 6	44	73
Rato 7	168	165
Rato 8	108	87
Rato 9	150	230
Rato 10	289	123
Rato 11	134	217
Rato 12	34	103
Rato 13	-	139
	n=12	n=13
X=	116	186
S=	72	83
EPM=	21	23

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	<u>IL-6</u>	<u>IL-10</u>
	pg/ml	pg/ml
Rato 1	50	155
Rato 2	67	199
Rato 3	29	74
Rato 4	24	170
Rato 5	60	138
Rato 6	31	64
Rato 7	15	58
Rato 8	50	0
Rato 9	55	90
Rato 10	24	33
Rato 11	13	48
Rato 12	15	0
Rato 13	-	93
	n=12	n=13
X=	36	86
S=	19	63
EPM=	5	17

ANEXO 2-Valores individuais das dosagens de TNF- α no liquido ascítico dos animais dos grupos Controle, Pancreatite e Pentoxifilina.

GRUPO CONTROLE

Ratos	<u>TNF-α</u>
	pg/ml
Rato 1	0
Rato 2	0
Rato 3	0
Rato 4	0
Rato 5	0
Rato 6	0
Rato 7	0
Rato 8	0
n=3	
X=	0
S=	0
EPM=	

GRUPO PANCREATITE

Ratos	<u>TNF-α</u>
	pg/ml
Rato 1	77
Rato 2	101
Rato 3	156
Rato 4	44
Rato 5	0
Rato 6	34
Rato 7	130
Rato 8	98
Rato 9	123
Rato 10	15
Rato 11	65
Rato 12	60
	n=12
X=	75
S=	48
EPM=	14

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	<u>TNF-α</u>
	pg/ml
Rato 1	89
Rato 2	86
Rato 3	41
Rato 4	0
Rato 5	0
Rato 6	36
Rato 7	0
Rato 8	46
Rato 9	35
Rato 10	33
Rato 11	0
Rato 12	55
	n=12
X=	35
S=	32
EPM=	9

ANEXO 3 - População bacteriana expressa em UFC/g de tecido.

Pâncreas			
	Controle	Pancreatite	Pentoxifilina
Rato 1	0	$0,50 \times 10^5$	0
Rato 2	0	$2,30 \times 10^5$	0
Rato 3	0	$0,20 \times 10^5$	0
Rato 4	0	$3,70 \times 10^5$	$0,03 \times 10^5$
Rato 5	0	$1,10 \times 10^5$	0
Rato 6	0	$3,0 \times 10^5$	$1,30 \times 10^5$
Rato 7	0	$0,20 \times 10^5$	0
Rato 8	0	0	0
Rato 9	0	$2,50 \times 10^5$	0
Rato 10	0	$1,50 \times 10^5$	0
Média	0,000	1,500	0,130
Desvio padrão	0,000	1,313	0,56

Linfonodos			
	Controle	Pancreatite	Pentoxifilina
Rato 1	0	$0,14 \times 10^5$	0
Rato 2	0	$0,016 \times 10^5$	$0,50 \times 10^5$
Rato 3	0	$0,34 \times 10^5$	$0,02 \times 10^5$
Rato 4	0	$0,02 \times 10^5$	0
Rato 5	0	0	$0,04 \times 10^5$
Rato 6	0	0	0
Rato 7	0	$0,30 \times 10^5$	0
Rato 8	0	$0,90 \times 10^5$	$0,05 \times 10^5$
Rato 9	0	$0,50 \times 10^5$	0
Rato 10	0	$1,20 \times 10^5$	0
Média	0,000	0,342	0,061
Desvio padrão	0,000	0,416	0,155

Fígado			
	Controle	Pancreatite	Pentoxifilina
Rato 1	0	$0,018 \times 10^5$	0
Rato 2	0	0	0
Rato 3	0	0	0
Rato 4	0	$0,13 \times 10^5$	0
Rato 5	0	0	0
Rato 6	0	0	0
Rato 7	0	$0,01 \times 10^5$	0
Rato 8	0	0	$0,15 \times 10^5$
Rato 9	0	$1,20 \times 10^5$	0
Rato 10	0	$0,60 \times 10^5$	0
Média	0,000	0,196	0,015
Desvio padrão	0,000	0,399	0,047

ANEXO 4 - Valores individuais do escore histológico nos grupos estudados.

Grupo Controle

	Edema	Necrose Acinar	Hemorragia	Necrose Gordurosa	Inflamação Perivascular
Rato 1	0,5	0,5	0	0	0
Rato 2	1	0	0	0	1,5
Rato 3	1,5	0	0	0	0
Rato 4	0,5	0	0	0	1
Rato 5	0,5	0	0	0	0,5
Rato 6	0,5	0	0	0	0,5
Rato 7	0,5	0	0,5	0	0
Rato 8	0,5	0	0	0	0
Rato 9	0,5	0	0	0	0
Rato 10	1	0	0	0	0,5
Média	0,700	0,050	0,050	0,000	0,400
Desvio padrão	0,350	0,158	0,158	0,000	0,516

Grupo Pancreatite

	Edema	Necrose Acinar	Hemorragia	Necrose Gordurosa	Inflamação Perivascular
Rato 1	3	4	1	2,5	2
Rato 2	2,5	4	1,5	0,5	3,5
Rato 3	1,5	2,5	0,5	0	2
Rato 4	2	3,5	1	0,5	1,5
Rato 5	2	2,5	0,5	0	1
Rato 6	1,5	2	0,5	0,5	1,5
Rato 7	2	3,5	0	0	1,5
Rato 8	2	2,5	1	0,5	1,5
Rato 9	2,5	0,5	0,5	0	2
Rato 10	1,5	2,5	0	0,5	1
Média	2,050	2,750	0,650	0,500	1,750
Desvio padrão	0,497	1,061	0,474	0,745	0,717

Grupo Pentoxifilina

	Edema	Necrose Acinar	Hemorragia	Necrose Gordurosa	Inflamação Perivascular
Rato 1	2,5	0,5	0	0,5	2,5
Rato 2	1	1,5	0	0	0,5
Rato 3	1	0,5	0	0	2
Rato 4	1	0	0	0	0,5
Rato 5	1	2,5	0	0	1,5
Rato 6	1,5	0,5	0	0	1,5
Rato 7	0,5	3,5	0	0	2
Rato 8	0,5	1,5	0	0	1
Rato 9	0,5	3,5	0	0	1,5
Rato 10	2	1,5	0	0	1
Média	1,150	1,550	0,000	0,050	1,400
Desvio padrão	0,669	1,257	0,000	0,158	0,658

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Norton ID, Clain JE. Optimising outcomes in acute pancreatitis. *Drugs* 2001; 61:1581-91.
2. Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HG. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Pancreatology* 2001; 1:63-68.
3. Carter R. Management of infected necrosis secondary to acute pancreatitis: a balanced role for minimal access techniques. *Pancreatology* 2003; 3:133-8.
4. Maravi-Poma E, Gener J, Alvarez-Lerma F, Olaechea P, Blanco A, Dominguez-Munoz JE. Early treatment of septic complications in severe acute necrotizing pancreatitis: a prospective, randomized, multicenter study comparing two regimens with imipenem-cilastatin. *Intensive Care Med* 2003; 10:271-75.
5. Uhi W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carte , Di Magno E, Banks PA, Whicomb DC, Dervenis C, Ulrich CD, Satake , Ghaneh P, Hartwing W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Buchles MW. IAP Guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 2: 565-73.

6. McNaught CE, Woodcock NP, Mitchell CJ, Rowley G, Johnstone D, MacFie J. Gastric colonization, intestinal permeability and septic morbidity in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 2:463-8.
7. Hartwing W, Werner J, Uhl W, Buchler MW. Management of infection in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9:423-8.
8. Clancy TE, Asheley SW. Current management of necrotizing pancreatitis. *Adv Surg* 2002; 36:103-21.
9. Liu TH, Kwong KL, Tamm EP, Gill BS, Brown SD, Mercer DW. Acute pancreatitis in ICU: value of clinic and radiologic prognosticators at predicting clinical course and outcome. *Crit Care Med* 2003; 31:1026-30.
10. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21: 130-5.
11. Coelho AMM, Machado MCC, Cunha JEM, Sampietre SM, Abdo EE. Influence of pancreatic enzyme content on experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26:230-34.
12. Sun B, Li HL, Gao Y, Xu J, Jiang HC. Factors predisposing to severe acute pancreatitis: evaluation and prevention. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1102-5.
13. Bassi C, Butturini G, Falconi M, Salvia R, Frigerio I, Pederzoli P. Outcome of open necrosectomy in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 128-32.

14. Machado MCC, Bacchella T, Cunha JEM, Jukemura J, Penteado S, Giovanolli ACV, Pinotti HW. Evolução das necroses pancreáticas. Influência do fator infecção. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo 1985; 40:120-124.
15. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. J Clin Gastroenterol 2000; 30: 343-56.
16. Coelho AMM, Kubrusly MS, Bonizzia A, Gonzalez Y, Abdo EE, Machado MCC. Efeito protetor da depleção de enzimas pancreáticas na evolução da pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo 1993; 48:106-111.
17. Machado MCC, Coelho AMM, Kubrusly MS, Bonizzia A, Pinotti HW. Reduction of pancreatic enzyme content and mortality in experimental acute pancreatitis in rats. Braz J Med Biol Res 1995; 28:471-475.
18. Bettinger JR, Grendell JH. Intracellular events in the pathogenesis of acute pancreatitis. Pancreas 1991;6:2-6.
19. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. J Pathol 2000; 190:117-125.
20. Coelho AMM, Machado MCC, Sampietre SN, Leite KRM, Oliveira VLL, Pinotti HW. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. Braz J Med Biol Res 1997; 30:947-953.

21. Coelho AMM, Machado MCC, Sampietre SN, Leite KRM, Molan NAT, Pinotti HW. Lesão hepática na pancreatite aguda experimental. Influência da redução da reserva enzimática do pâncreas. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo 1998; 53:104-109.
22. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. Curr Opin Investig Drugs 2001; 2:496-501.
23. Riche FC, Cholley BP, Laisne MJ, Vicaud E, Panis YH, Lajeunie EJ, Boudiaf M, Valleur PD. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. Surgery 2003; 133: 257-62.
24. Makhija R, Kingsnorth NA. Cytokine storm in acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2002; 9: 401-10.
25. Jancar S, Abdo EE, Sampietre SN, Kwasniewski F, Coelho AMM, Bonizzia A, Machado MCC. Effect of PAF antagonists on cerulein-induced pancreatitis. J Lipid Mediators Cell Signalling 1995; 11:41-49.
26. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. Am J Surg 1998; 175:76-83.
27. Brivet FG, Emilie D. Predictive value of cytokines during acute severe pancreatitis. Crit Care Med 2000; 28:2673.
28. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiology implications. Gut 2000; 47:546-552.

29. Cunha JEM, Salem MZ, Coelho AMM, Kubrusly MS, Sampietre SN, Machado MCC. Influence of pancreatic enzyme content on pulmonary lesions on experimental acute pancreatitis. HPB 2000; 2:389-393.
30. Abdo EE, Gonzales Y, Machado MCC, Aguirre-Costa PL, Gonzalez YF, Sampietre SN, Pinotti HW. Mononuclear phagocytic system in acute pancreatitis. Braz J Med Res 1993; 26: 285-90.
31. Fukushima R, Alexander JW, Wu JZ, Mao JX, Szczur K, Stephens AM, Ogle JD, Ogle CK. Time course of production of cytokines and prostaglandin E2 by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. Circ Shock 1994; 42:154-62.
32. Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. J Clin Gastroenterol 2003; 37:263-6.
33. Closa D, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Prostaglandin D2, F2 alpha, E2, and E1 in early phase of experimental acute necrohemorrhagic pancreatitis in rats. Pancreas 1994; 9:73-7
34. Choudhry MA, Fazal N, Namak SY, Haque F, Ravindranath T, Sayeed MM. PGE2 suppresses intestinal T cell function in thermal injury: a cause of enhanced bacterial translocation. Shock 2001; 16:183-188.
35. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/TNF (Tumor Necrosis Factor). Lancet 1989; 1: 1122-26.

36. Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, Dagorn JC, Iovanna JL. Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation. *Gastroenterology* 2000; 119:816-28.
37. Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okajima T, Okamoto K, Ogawa M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2000; 21:141-6.
38. Rongine AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 960-67.
39. Manabe T. Current aspects of the pathophysiology of acute pancreatitis and therapeutic effects of an inflammatory cell infiltration inhibitor. *J Gastroenterol* 2003; 38:305-7.
40. Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KKW. Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg* 1993; 165:46-51.
41. Foitzik T, Fernandez-Del-Castillo C, Ferraro MJ, Mithofer K, Rattner DW, Warshaw AL. Pathogenesis and prevention of early pancreatic infection in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg* 1995; 222:179-185.
42. Runckel NSF, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, Larocco MT, Miller TAJ. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res* 1991; 51:18-23.

43. Souza LJ, Sampietre SN, Figueiredo S, Yria Y, Machado MC, Pinotti HW. Translocação bacteriana na pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo 1996; 31:116-120.
44. Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS, Knowles CH, Leite KR, Jancar S, Cunha JEM, Machado MCC. Effect of platelet-activating antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. J Gastrointest Surg 2001; 5:364-70.
45. Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. Br J Surg 1997; 84:1340-50.
46. Samuel S, Lanig S, Lux A, Keese M, Gretz N, Nichterlein T, Sturn J, Lohr M, Post S. The gut origin of bacterial pancreatic infection during acute experimental pancreatitis in rats. Pancreatology 2002; 2: 449-55.
47. Thomson A. Bacterial translocation in acute pancreatitis. J gastroenterol Hepatol 2003; 18: 1214.
48. Macintire DK, Bellhorn TL. Bacterial translocation: clinical implications and prevention. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2002; 32: 1165-78.
49. Cevikel MH, Ozgun H, Boylu S, Demirkiran AE, Sakarya S, Culhaci N. Nitric oxide regulates bacterial translocation in experimental acute edematous pancreatitis. Pancreatology 2003; 3: 329-35.

50. Ammori BJ, Cairns A, Dixon MF, Larvin M, McMahon MJ. Altered intestinal morphology and immunity in patients with acute necrotizing pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 490-6.
51. Tarpila E, Nystrom PO, Frazem L. Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg* 1993; 159:109-13.
52. Isenmann R, Beger HG. Bacterial infection of pancreatic necrosis: Role of bacterial translocation, impact of antibiotic treatment. *Pancreatology* 2001; 1:79-89.
53. Reber HA. Pathogenesis of infection in pancreatic inflammatory disease. *Pancreatology* 2001; 1:207-209.
54. Foitzik T. The enteral factor in pancreatic infection. *Pancreatology* 2001; 1:217-223.
55. Juvonen PO, Alhava EM, Takala JA. Gut permeability in patients with acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 12:1314-1318.
56. Cicalese L, Sahai A, Sileri P, Rastellini C, Subbotin V, Ford H, Lee K. Acute pancreatitis and bacterial translocation. *Diges Disea Scien* 2001; 46:1127-1132.
57. Wells CL. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplant Proc.* 1996; 28:2653-6
58. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23:217-44.

59. Newark NJ. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery* 2002; 131: 241-244.
60. Hollander D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Chron's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 721-6.
61. Wang XD, Andersson R. Intestinal brush border membrane function. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 289-99.
62. Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35.
63. Wang X, Gong Z, Wu K, Wang B, Yuang Y. Gastrointestinal dysmotilit in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 57-62.
64. Fukushima R, Alexander JW, Gianotti L, Pyles T, Ogle CK. Bacterial translocation-related mortality may be associated with neutrophilmediated organ damage. *Shock* 1995; 3:323-8.
65. Wang X, Andersson R, Soltesz V, Leveau P, Ihse I. Gut origin sepsis, macrophage function, and oxygen extraction associated with acute pancreatitis in the rat. *World J Surg* 1996; 20:299-307; discussion 307-8.
66. Nieuwenhuijzen GA, Haskel Y, LU Q, Berg RD, van Rooijen N, Goris RJ, Deitch EA. Macrophage elimination increases bacterial translocation and gut-origin septicemia but attenuates symptoms

and mortality rate in a model of systemic inflammation. *Ann Surg* 1993; 218:791-9.

67. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. *Arch Surg* 1987; 122:48-53.

68. Shocorer JF, Antithrombotic potencial of pentoxifylline: a hemorrheologically active drug. *Angiology* 1985;36:387-398.

69. Wang P, Ba ZF, Zhou M, Tait SM, Chaudry IH. Pentoxifylline restores cardiac output and tissue perfusion after trauma-hemorrhage and decreases susceptibility to sepsis. *Surgery*, 1993;114:352-358.

70. Marzi I, Maier M, Herzog C, Bauer M. Influence of pentoxifylline on liver microcirculation and leukocyte adhesion after hemorrhagic shock in rat. *J Trauma*. 1996;40:90-96.

71. Marton J, Farkas G, Takacs T, Nagy Z, Szasz Z, Varga J, Jarmay K, Balogh A, Lomovics J. Beneficial effects of pentoxifylline treatment of experimental acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med* 1998;197:293-299.

72. Kocdor MA, Kocdor H, Gulay Z, Gokce O. The effects pf pentoxifylline on bacterial translocation after intestinal obstruction. *Shock*. 2002; 18: 148-51.

73. Doherty GM, Christian Jensen J, Alexander R, et al. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 1991;110:192-198.

74. Yada-Langui MM, Coimbra R, Lancellotti C, Mimica I, Garcia C, Correia Jr N, Rocha e Silva M. Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury and bacterial translocation after hemorrhagic shock. *Shock* 2000;14:594-598.
75. Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gomez-Cambronero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerda M, Lledo S, Vina J, Sastre J. Effect of simultaneous inhibition of TNF- α production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann Surg.* 2004; 240(1):108-16.
76. Gomez-Cambronero L, Campus B, de La Asunsion JG, Cerda M, Pellin A, Pallardo FV, Calvete J, Sweiry JH, Mann GE, Vina J, Sastre J. Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:670-676.
77. Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Experimental model of acute pancreatitis. *British J Surgery* 1994; 81:1096-1103.
78. Rattner DW. Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 219; 6-9.
79. Goodman & Gilman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10th edition 2001 McGraw-Hill.
80. Strain B. Quantitative Bacteriology: Tissues and aspirates. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, American Society for Microbiology. 1992,1:1.16-1.4.

81. Murray PR, Jo Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 7^o ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1999.
82. Murray PR, Jo Baron E. Manual of Clinical Microbiology. 8^o ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 2001.
83. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski R, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating in acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1992; 215:44-56.
84. Altman DG. Practical statistics for medical research. 1^o ed. Londres, Chapman & Hall, 1991.
85. Numro BH. Statistical methods for health care research. 4^o ed. Portland, Lippincott, 2001.
86. Farkas G, Marton J, Mandi Y, Leindler L. Surgical management and complex treatment of infected pancreatic necrosis: 18-year experience at a single center. J Gastrointest Surg. 2006; 10(2):278-85.