André Siqueira Matheus

**Translocação bacteriana na pancreatite aguda :
efeito da administração de indometacina**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo

Orientador: Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado

**São Paulo
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Matheus, André Siqueira

Translocação bacteriana na pancreatite aguda : efeito da administração de indometacina / André Siqueira Matheus. -- São Paulo, 2004.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: Marcel Cerqueira Cesar Machado.

Descritores: 1.RATOS WISTAR 2.MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS
3.GRUPOS CONTROLE 4.PANCREATITE NECROSANTE AGUDA/induzido
quimicamente 5.ÁCIDO TAUROCÓLICO/metabolismo 6.INDOMETACINA/uso
terapêutico 7.PANCREATITE NECROSANTE AGUDA/terapia
8.TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA/efeitos de drogas 9.PANCREATITE
NECROSANTE AGUDA/mortalidade

USP/FM/SBD-70/04

“Learning is finding out what you already know. Doing is demonstrating that you know it. Teaching is reminding others that they know just as well as you. We are all learners, doers, teachers.”

Richard Bach

Este trabalho foi 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.

À minha família base de minha formação e crescimento:

Ao meu querido e saudoso avô José Ulpiano, para sempre exemplo de caráter e dignidade.

Aos meus pais, José Mario e Maria Cecília, aos meus irmãos, Henrique, Daniel e Tomaz e a minha querida Mani, pelo amor incondicional e apoio irrestrito.

À minha amada Sheila, pelo amor, carinho e compreensão.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, pelo privilégio de te-lo como orientador e pela oportunidade do convívio. A quem devo o meu amadurecimento profissional e científico. Minha eterna gratidão pelo apoio e confiança depositados e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Joaquim José Gama-Rodrigues, pela oportunidade de participar da disciplina de cirurgia do aparelho digestivo.

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

Ao Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha, pelos ensinamentos, incentivo e sugestões.

Às amigas Ana Maria M. Coelho e Sandra N. Sampietre, a quem devo a realização deste trabalho, pelo auxílio fundamental na sua realização e pelo carinho e amizade com o qual sempre fui tratado.

Aos grandes amigos Renato Soares de Godoy e Dra. Cíntia Yoko Morioka por todo apoio e companheirismo ao longo desta jornada.

Ao Dr. José Jukemura, pelo apoio, ensinamentos, sugestões e principalmente pela amizade oferecida.

Aos Drs. André Luis Montagnini, Emílio Elias Abdo e Sônia Penteado e ao Prof. Dr. Telésforo Bacchella, pelo apoio, sugestões e ensinamentos.

Ao amigo Dr. Lourenilson José de Souza, pelo fundamental apoio e orientações fornecidas.

Às amigas Nilza Aparecida T. Molan e Marcia S. Kubrusly, pelo apoio para a realização deste trabalho.

Às Dras. Sheila A. Coelho e Rosely Antunes Patzina, pela elaboração da análise histológica deste projeto.

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

À estaticista Júlia Tizue Fukushima, pelas orientações e auxílio na análise estatística.

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

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 figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	9
3 – MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Animais de experimentação	10
3.2 Delineamento experimental	10
3.3 Indução da pancreatite	12
3.4 Administração de indometacina e solução salina	13
3.5 Análise clínica	15
3.6 Dosagem de mediadores inflamatórios	15
3.7 Estudo Microbiológico	16
3.8 Análise histológica	18
3.9 Estudo da mortalidade	19
3.10 Análise estatística	21
3.11 Aspectos éticos	22
4 – RESULTADOS	23
4.1 Análise clínica	23
4.2 Dosagem de mediadores inflamatórios	26
4.3 Estudo microbiológico – translocação bacteriana	28
4.4 Estudo microbiológico – infecção	33
4.5 Estudo microbiológico – qualitativo	35
4.6 Aspectos histológicos	36
4.7 Mortalidade	40

5 – DISCUSSÃO	42
6 – CONCLUSÕES	51
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Lista de figuras

Figura 1. Aspecto do arco duodenal e do pâncreas antes da indução da pancreatite	14
Figura 2. Aspecto do arco duodenal e do pâncreas após a indução da pancreatite	14
Figura 3. Níveis séricos de IL-6 duas horas após a indução da PA	26
Figura 4. Níveis séricos de IL-10 duas horas após a indução da PA	27
Figura 5. Níveis séricos de PGE2 duas horas após a indução da PA	27
Figura 6. Culturas positivas no tecido pancreático	28
Figura 7. Culturas positivas nos linfonodos mesentéricos	30
Figura 8. Culturas positivas no tecido hepático	31
Figura 9. Hemoculturas positivas	32
Figura 10. Culturas positivas da cavidade peritoneal	33
Figura 11. Valores correspondentes à ocorrência de infecção pancreática	34
Figura 12. Valores correspondentes à ocorrência de infecção nos linfonodos mesentéricos	34
Figura 13. Valores correspondentes à ocorrência de infecção no tecido hepático	35

Figura 14. Distribuição percentual das bactérias identificadas no grupo Pancreatite	36
Figura 15. Distribuição percentual das bactérias identificadas no grupo Indometacina	36
Figura 16. Aspecto microscópico de fragmento de pâncreas de rato com PA (Grupo Pancreatite)	37
Figura 17. Achados histológicos 24 hs após a indução da pancreatite Aguda	38
Figura 18. Valores correspondentes ao grau de inflamação na mucosa intestinal	39
Figura 19. Comparação entre a curva de sobrevida dos respectivos grupos	41

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos grupos para coleta de dados	11
Tabela 2. Classificação do processo inflamatório pancreático	20
Tabela 3. Incidência de ascite por grupo	23
Tabela 4. Incidência de bloqueio na cavidade peritoneal por grupo	24
Tabela 5. Ocorrência de peritonite por grupo	25
Tabela 6. Aspecto macroscópico do pâncreas	25
Tabela 7. População bacteriana expressa em UFC/g x 10 ⁵ no pâncreas	28
Tabela 8. População bacteriana expressa em UFC/g x 10 ⁵ nos linfonodos mesentéricos	30
Tabela 9. População bacteriana expressa em UFC/g x 10 ⁵ no fígado	31

Resumo

MATHEUS, AS. Translocação bacteriana na pancreatite aguda: efeito da administração de indometacina.

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. A ocorrência de translocação bacteriana durante a pancreatite aguda tem sido descrita em uma série de estudos prévios, onde os autores têm correlacionado a translocação bacteriana com a ocorrência de infecção pancreática. A indometacina tem sido utilizada para reduzir a translocação bacteriana em modelos experimentais de choque hemorrágico e grandes queimados. O objetivo deste trabalho foi determinar se a translocação bacteriana e a infecção pancreática podem ser reduzidas com a administração de indometacina. Foi utilizado um modelo experimental de pancreatite aguda grave através da injeção intraductal de taurocolato de sódio a 2,5%. Cento e quatorze 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 Indometacina (animais submetidos à indução da pancreatite aguda seguida da administração intraperitoneal de 3 mg/Kg de indometacina). Foi realizada a dosagem sérica das interleucinas 6 e 10 e prostaglandina E2 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. As culturas realizadas do pâncreas, fígado, linfonodos mesentéricos, sangue e cavidade peritoneal foram expressas em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama. A ocorrência de infecção pancreática foi considerada como positiva quando a concentração de bactérias expressa em UFC/g foi maior que 10^5 . Houve significativa redução dos níveis de IL-6, IL-10 e PGE2 no grupo Indometacina ($p < 0,05$). Não foi observada a presença de bactérias ou a ocorrência de translocação bacteriana no grupo Controle. O grupo Pancreatite apresentou elevado acúmulo de bactérias nos tecidos analisados, o que determinou uma alta incidência de translocação bacteriana e infecção pancreática ($p < 0,05$). Uma diminuição estatisticamente significativa foi observada na quantidade de bactérias encontradas no pâncreas do grupo Indometacina quando comparado ao grupo Pancreatite ($p < 0,05$), determinando, portanto, uma menor incidência de infecção pancreática no grupo Indometacina ($p < 0,05$). Não se observou variação da mortalidade dos grupos Pancreatite e Indometacina. Concluímos através dos dados obtidos com este trabalho experimental que a administração de indometacina foi capaz de reduzir a população bacteriana e a incidência de infecção pancreática na pancreatite aguda experimental. No entanto, a administração de indometacina não foi capaz de alterar a taxa de mortalidade.

Summary

MATHEUS, AS. Bacterial translocation in acute pancreatitis: effect of indomethacin administration.

Pancreatic infection is the most serious complication of severe acute pancreatitis (AP) with a mortality rate up to 80%. The pathogenesis of pancreatic infection in AP remains poorly understood. Increased gut bacterial translocation (BT) in AP has been demonstrated in a number of previous studies, where the authors have been correlated the BT with pancreatic infection. Indomethacin has been used to reduce BT in experimental models of shock, and burn injury. The purpose of this study was to determinate if the BT and pancreatic infection can be reduced in severe AP after Indomethacin administration. An experimental model of severe AP by injection of 0.5 ml taurocholic acid 2.5 % into the pancreatic duct was utilized. Hundred fourteen male Wistar rats were divided in 3 groups: Sham (surgical procedure without AP induction), Pancreatitis (AP Induction), and Indomethacin (AP induction plus intraperitoneally administration of 3 mg/kg of Indomethacin). The levels of interleukins 6 and 10 and prostaglandin E2 were measured 2 hours after the pancreatitis induction. We analyzed the occurrence of BT to the pancreas with bacterial cultures performed 24 h after the AP induction. The cultures results were expressed in 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 significant reduction of IL-6, IL-10, and PGE2 was observed in

indomethacin group. Bacterial translocation or bacterial accumulation was not observed in the Sham group. We observed bacterial translocation and a higher bacterial accumulation in the pancreas in Pancreatitis group ($p < 0.05$). A significantly lower bacterial accumulation expressed in CFU was observed in pancreatic tissue of Indomethacin group ($p < 0.05$). The administration of Indomethacin did not show reduction on mortality rate. The pancreatic infection was lower in Indomethacin group ($p < 0.05$). In conclusion, the administration of Indomethacin may reduce the bacterial population in the pancreas and the occurrence of pancreatic infection. However, indomethacin could not reduce the mortality rate in this experimental model.

1 – INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) grave é uma doença que mantém altos índices de morbidade e mortalidade mesmo com os mais recentes avanços em diagnóstico, prevenção e tratamento,¹⁻³ tornando a PA um desafio para as mais diversas especialidades envolvidas em seu tratamento. Pacientes que desenvolvem PA grave requerem hospitalização prolongada, cuidados intensivos, muitas vezes necessitando de suporte ventilatório e hemodinâmico e apresentam elevada taxa de mortalidade com valores que variam entre 10 a 15%, mesmo quando tratados em centros especializados. A mortalidade pode se tornar superior a 40% quando a PA está associada à infecção pancreática.

1-6

Nas últimas décadas, um grande esforço vem sendo despendido na busca de respostas para importantes questões relacionadas à fisiopatologia e ao tratamento da PA grave. Uma série de questões foi respondida, mas outras permanecem sem resposta e são de fundamental importância para o entendimento da fisiopatologia e o desenvolvimento de novas formas terapêuticas, possibilitando assim uma melhora no prognóstico desta grave doença.^{1,3,7-16} Estes fatores estimulam o constante investimento financeiro e

intelectual em pesquisas que visem o esclarecimento e a descoberta de novas formas terapêuticas para o tratamento da PA grave.

A PA apresenta uma variação clínica bastante ampla, podendo se apresentar desde um quadro leve com edema do tecido pancreático até quadros dramáticos com extensa necrose pancreática, sendo a evolução e o quadro clínico relacionados com a intensidade e extensão da lesão pancreática.^{6,9,13}

O processo fisiopatológico da PA inicia-se na ativação intra-acinar de zimogênios e conseqüente destruição das células pancreáticas, dando origem inicialmente a um processo inflamatório local, seguido de eventos sistêmicos, que variam a intensidade de indivíduo para indivíduo e determinam uma grande variação de quadros clínicos, o que é comumente observado.^{9,15-20}

Vários fatores individuais são descritos como responsáveis pela maior probabilidade em se desenvolver PA grave, como o volume do parênquima pancreático, a quantidade de enzimas pancreáticas presentes nos ácinos, a presença de obesidade e a presença de problemas microcirculatórios.^{10,14,15} No entanto, o que se observa na prática clínica é uma grande variação nos parâmetros clínicos dos pacientes que desenvolvem PA. O que se tem como certo nestas situações é a diferença na intensidade da resposta a um mesmo evento inflamatório inicial.^{15,19}

A resposta inflamatória na PA grave se caracteriza por um processo sistêmico desencadeado pela lesão do tecido pancreático, ao qual se segue uma série de eventos inflamatórios como a liberação de potentes mediadores, tais como, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas 1, 6 e 8, fator

ativador plaquetário (PAF) e prostaglandina E2.²¹⁻²⁶ Estes mediadores, quando associados a um processo inflamatório intenso, 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 a ocorrência da insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (IMOS).^{19,23,27-29}

Portanto, a gravidade da doença não é determinada apenas pelo grau da lesão pancreática, mas também pela intensidade e quantidade de células inflamatórias ativadas e pela liberação de citocinas e de outros mediadores pro-inflamatórios.^{15,22,26-30} Desta forma o prognóstico da doença está relacionado com a intensidade com que ocorre a resposta inflamatória.

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.^{22,26,27,28,31,32}

São muitos os fatores responsáveis pelo prognóstico desfavorável na PA grave, dentre eles se destacam a ocorrência de complicações decorrentes da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e a ocorrência de infecção pancreática.^{5,6,8,23,27,28,31,33,34,35}

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 evento agudo, é caracterizada por eventos relacionados a SRIS, tais como instabilidade

hemodinâmica e insuficiência respiratória, sendo a taxa de mortalidade diretamente relacionada à ocorrência destes eventos. Posteriormente, surgem as complicações sépticas que são responsáveis por significativa piora no prognóstico e caracterizam a segunda fase na evolução da PA grave.

2,6,9,19,28,34,35,36

A infecção pancreática é uma grave complicação que está presente em 8 a 12% dos casos de PA, sendo que a incidência se eleva para 30 a 40% dos casos de PA que estão associados à necrose pancreática, sendo a infecção pancreática responsável por mais de 80% das mortes em pacientes com PA.

2,3,4,5,6,7,8,16,17,36,37,38

Portanto, 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. 1,3,4,5,9,38

A translocação bacteriana tem sido considerada como o principal evento responsável pelo desenvolvimento de infecção do tecido pancreático na PA grave. 3,4,36,39-44 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 prognóstica. 4,39,43,44

Em trabalhos anteriores, nosso grupo comprovou a presença de translocação bacteriana na PA, sendo a mesma proporcional à gravidade das lesões histológicas do pâncreas. 40,41

Os fatores que determinam a translocação bacteriana ainda não foram esclarecidos por completo. 38,39,43,45-48 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 intraluminais 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.^{48,56-60}

Apesar dos estudos que determinaram o funcionamento da barreira intestinal, o evento translocação bacteriana permanece pouco esclarecido quando se refere à via de disseminação bacteriana. São várias as hipóteses 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.^{49-53,56,60,61}

Foi demonstrado que as bactérias entéricas após fagocitadas por macrófagos na parede intestinal são carregadas para tecidos à distância e liberadas por macrófagos defectivos ou mortos, sendo desta forma a disseminação bacteriana realizada de forma direta por macrófagos.⁶²⁻⁶⁶ Tal via de disseminação parece representar importante fator na ocorrência de translocação bacteriana em eventos associados a processos inflamatórios sistêmicos tais como a PA, choque hemorrágico e grandes queimados.

A resposta desencadeada pela lesão do tecido pancreático leva a ativação da fosfolipase lisossômica, que ao atuar na membrana celular do ácido, promove a síntese e liberação de ácido araquidônico, que é substrato para a formação de uma série de mediadores inflamatórios, entre eles as prostaglandinas.^{23,28,31,67-69}

A prostaglandina E2 é sintetizada principalmente pelo endotélio vascular, plaquetas e rins e possui importante ação inflamatória, sendo responsável pela alteração da permeabilidade vascular e pela ativação e migração de macrófagos.⁶⁹⁻⁷⁴ Por outro lado foi demonstrado que elevados níveis de prostaglandina E2 provocam a inibição da expressão de antígenos de superfície em macrófagos, causando uma importante deficiência na função macrofágica e permitindo assim a ocorrência da translocação bacteriana.^{70,75-80} Este fato suporta a teoria de participação dos macrófagos na translocação bacteriana em inflamações sistêmicas graves.

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.^{31-33,73} A concentração circulante de IL-6 aumenta significativamente após lesões celulares tais como trauma, grandes queimaduras e pancreatite aguda grave.^{73,76}

A IL-10 é considerada a principal interleucina com ação anti-inflamatória, sendo responsável pela diminuição da produção de IL-1, IL-6 e IL-8 e pela depleção 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 tratamento da PA.^{31,32,74}

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 liberação de IL-6 e a liberação de IL-10. Imediatamente após o início da cascata inflamatória sistêmica desencadeada pela lesão do tecido pancreático é observado o aumento de mediadores pró-inflamatórios como a IL-2, IL-6, IL-8, PAF, TNF- α e PGE2, sendo seguido então da liberação de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 e a IL-11 com a finalidade de modular o processo inflamatório, desta forma o período inicial da PA se caracteriza por níveis elevados de IL-6 e IL-10, havendo uma relação direta entre os níveis das interleucinas e a gravidade da doença.^{27,28,33,74,75}

Desta forma, a utilização de drogas anti-inflamatórias que possam interferir na seqüência de eventos desencadeados pela pancreatite aguda e diminuir a intensidade da resposta inflamatória e suas conseqüências como a ocorrência de IMOS e translocação bacteriana mostrou-se como sendo um importante caminho para o tratamento da PA e prevenção de suas complicações.^{38,43,63,67,73}

A indometacina é um antiinflamatório não esteróide que atua inibindo a síntese de prostaglandina e foi utilizada em modelos experimentais de queimados onde foi observada uma significativa redução na ocorrência de translocação bacteriana. Este fato sugere um possível efeito causal das prostaglandinas na ocorrência de translocação bacteriana.^{69,70} A diminuição na capacidade bactericida dos macrófagos causada pela ação das

prostaglandinas foi considerada como o fator responsável pelo aumento da translocação bacteriana nestes modelos experimentais.⁷⁰

Níveis elevados de prostaglandinas teriam uma ação direta sobre os macrófagos reduzindo sua ação bactericida, de tal forma que os macrófagos exerceriam o papel de carreadores de bactérias oriundas da luz intestinal para os mais diversos tecidos.^{70,73,81,82}

A importância da reação inflamatória na PA e suas implicações foram descritas, verificando-se os efeitos deletérios de níveis elevados de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios na PA, sendo responsáveis pela ocorrência de alteração da perfusão pancreática, aumento da isquemia e necrose do tecido pancreático e piora do prognóstico.^{82,83}

Estudos experimentais demonstraram melhora significativa na evolução, no estado hemodinâmico e diminuição da gravidade da PA após o uso de indometacina, evento este atribuído à possível redução dos níveis de prostaglandina.⁸³⁻⁸⁵

Estes dados demonstram a importância da prostaglandina nos eventos inflamatórios da PA e sugerem a possível relação desta substância no evento da translocação bacteriana e infecção pancreática.

A utilização de drogas que diminuam a translocação bacteriana e, por conseguinte, a ocorrência de infecção associada aos quadros de PA e que diminuam a gravidade do processo inflamatório e suas complicações poderia ser a chave para a melhora do prognóstico desta patologia, reduzindo assim seus altos índices de morbidade e mortalidade.

2 - OBJETIVOS

A finalidade desta pesquisa é estudar o efeito da administração de indometacina na PA experimental sobre os eventos produção de interleucinas, translocação bacteriana, infecção pancreática e mortalidade, além de avaliar a relação entre pancreatite aguda grave e o fenômeno translocação bacteriana, procurando contribuir para o entendimento de seus mecanismos fisiopatológicos e fornecer subsídios para a prevenção e o tratamento desta grave doença.

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 - ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados neste estudo 114 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, ambiente com temperatura controlada (20-22°C) e com alimentação padrão e água *ad libitum*.

3.2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estudados três grupos, com 38 ratos em cada grupo e distribuídos da seguinte forma (Tabela 1):

Grupo I - Controle: constituído por 38 animais que foram submetidos à realização do procedimento cirúrgico sem a indução de PA e posterior administração de solução salina estéril 0,25 ml/rato por via intraperitoneal.

Grupo II – Pancreatite: constituído por 38 animais que foram submetidos à indução de PA através da administração de taurocolato de sódio a 2,5% e posterior administração de solução salina estéril 0,25 ml/rato por via intraperitoneal.

Grupo III – Indometacina: constituído por 38 animais, que foram submetidos à indução de PA através da administração de taurocolato de sódio a 2,5% e posterior administração de indometacina 3 mg/kg por via intraperitoneal.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos para coleta de dados

	Controle	Pancreatite	Indometacina
DOSAGEM MEDIADORES INFLAMATÓRIOS 2 HORAS	8 Ratos	8 Ratos	8 Ratos
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA 24 HORAS	10 Ratos	10 Ratos	10 Ratos
MORTALIDADE	20 Ratos	20 Ratos	20 Ratos

Cada grupo foi submetido à dosagem sérica das interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10) e prostaglandina E2, sendo que as amostras foram coletadas duas horas após a indução da PA, sendo utilizado um *n* igual a 8 ratos em cada grupo.

A avaliação da translocação bacteriana foi realizada através da coleta de material (pâncreas, linfonodos mesentéricos, fígado, sangue e líquido peritoneal) 24 horas após a indução da PA, sendo utilizado um n igual a 10 ratos para cada grupo.

O índice de mortalidade foi avaliado em todos os grupos. Os animais foram mantidos vivos por sete dias e receberam a administração de solução salina (grupos controle e pancreatite) e de indometacina (grupo indometacina) imediatamente após a indução da PA e doses subsequentes foram administradas a cada 24 horas, sendo iniciadas após a indução da PA e mantidas por um período total de 48 horas.

3.3 - INDUÇÃO DA PANCREATITE

A pancreatite aguda foi induzida através de injeção direta e 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.⁸⁶⁻⁸⁹

O procedimento obedeceu à seguinte seqüência: anestesia dos animais com administração de cloridrato de cetamina (Ketalar®) 0,2 ml/100g de peso, através de injeção intramuscular, tricotomia abdominal, anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo, colocação de campos estéreis, incisão mediana infra xifoídia de aproximadamente 1,0 cm, exteriorização do arco duodenal e pâncreas, identificação do ducto biliar e posterior oclusão do mesmo 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 ocorrência de inflamação, necrose gordurosa, hemorragia e edema, lesões presentes e visualizadas imediatamente após a infusão de taurocolato de sódio (Figuras 1 e 2).

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

3.4 - ADMINISTRAÇÃO DE INDOMETACINA E SOLUÇÃO SALINA

As substâncias foram administradas por via intraperitoneal, imediatamente após a indução da PA, respeitando os mais rigorosos critérios de assepsia e anti-sepsia na manipulação e administração das mesmas.^{70,90,91}

Indometacina

Foi administrada indometacina 3 mg/kg (Indomethacin, Sigma-Chemical Company™, St. Louis, U.S.A.) por via intraperitoneal logo após a indução da PA, sendo repetida a administração a cada 12 horas após a dose inicial no grupo Indometacina, respeitando a farmacocinética da droga.^{70,90,91}

Solução Salina

Foi administrada solução salina estéril 0,25 ml/rato por via intraperitoneal logo após a indução da PA e doses subseqüentes foram administradas a cada 24 horas após a indução da PA nos grupos Controle e Pancreatite.

Figura 1. 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 2. Aspecto do arco duodenal e do pâncreas após a indução da pancreatite. Observa-se o ducto biliar cateterizado e ocluído junto ao hilo hepático e o arco duodenal reparado.

3.5 - ANÁLISE CLÍNICA

Durante a coleta dos tecidos para análise microbiológica foi realizada uma análise descritiva dos seguintes aspectos clínicos e anatômicos da cavidade peritoneal: presença ou ausência de ascite, presença ou ausência de bloqueio na cavidade peritoneal, a presença de peritonite e se a mesma era restrita ao pâncreas e tecidos peri-pancreáticos ou generalizada e o aspecto macroscópico do pâncreas.

A coleta dos dados clínicos foi realizada 24 hs após a indução da PA e seguiu um protocolo pré-estabelecido.

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), interleucina-10 (IL-10) e prostagladina E2 (PGE2).

As amostras foram colhidas duas horas após a indução da PA e imediatamente centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes estocados a -50°C. Os resultados serão expressos em pg/ml.

A determinação quantitativa dos mediadores inflamatórios foi realizada por enzimoimunoensaio (ELISA) através da utilização dos kits da *Biosource International Cytoscreen*™.

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

As amostras foram preparadas de acordo com técnica descrita em trabalhos anteriores realizados neste laboratório, ^{40,41} semeadas em meios de cultura e incubadas em estufas para crescimento de bactérias aeróbias. ⁹²⁻⁹⁴

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

Para a determinação quantitativa da população bacteriana foi utilizada técnica descrita no *Clinical Microbiology Procedures* e expressa em unidades formadoras de colônias (UFC/g tecido).⁶³ Foi utilizada a seguinte fórmula:

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

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 do sistema automatizado *Vitek System*®.^{93,94}

A translocação bacteriana foi analisada de duas formas, inicialmente foi considerada como positiva na presença de qualquer crescimento bacteriano nos tecidos estudados e posteriormente realizou-se a comparação quantitativa

das bactérias encontradas em cada um dos grupos estudados, através da análise do número de microorganismo expresso em UFC/g.

Os tecidos foram considerados infectados quando a população bacteriana era superior a 10^5 UFC/g.⁹¹

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 realização da análise da cavidade peritoneal e coleta de material para análise microbiológica, foram coletados fragmentos do pâncreas, linfonodos mesentéricos, fígado e intestino delgado (íleo terminal). 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 de um critério para a classificação do processo inflamatório pancreático proposto por Schmidt et al ⁹⁵, analisando as seguintes variáveis: edema, necrose acinar, hemorragia, necrose gordurosa, inflamação e infiltrado perivascular (Tabela 2). 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.^{95,96}

Foram analisados, do ponto de vista histológico, fragmentos do íleo terminal, que foram coletados de forma aleatória em quatro diferentes segmentos a partir de vinte centímetros da válvula íleo-cecal. Quantificou-se o grau de inflamação presente na alça analisada e a presença ou ausência de erosão ou ulceração da mucosa intestinal.

Os linfonodos mesentéricos foram coletados e analisados com referência a presença ou a ausência de hiperplasia folicular e hiperplasia sinusal.

Fragmentos hepáticos foram coletados e analisados com relação à presença ou ausência de inflamação do espaço porta, inflamação do lóbulo hepático, necrose hepato-celular e hiperplasia das células de Kupffer.

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 60 ratos, que receberam a administração de solução salina ou indometacina de acordo com delineamento experimental proposto. A administração da droga estudada e da solução salina foi realizada até 48 horas após a indução de PA e os animais foram observados por 7 dias, quando então foram sacrificados.

Tabela 2. Classificação do processo inflamatório do tecido pancreático proposta por Schmidt *et al.*

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 perivasculars ou intralobulares/CGA	0
2-5 leucócitos perivasculars ou intralobulares/CGA	0,5
6-10 leucócitos perivasculars ou intralobulares/CGA	1
11-15 leucócitos perivasculars ou intralobulares/CGA	1,5
16-20 leucócitos perivasculars ou intralobulares/CGA	2
21-25 leucócitos perivasculars ou intralobulares/CGA	2,5
26-30 leucócitos perivasculars ou intralobulares/CGA	3
>30 leucócitos/CGA ou microabscessos focais	3,5
>35 leucócitos/CGA ou microabscessos confluentes	4

3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos avaliados foram comparados entre os diferentes grupos utilizando o teste da razão de verossimilhança, quando se obtiveram valores com diferença estatística significativa foi realizada comparação dois a dois utilizando o teste t de Student e o teste exato de Fisher.^{97,98}

Os resultados das dosagens séricas dos mediadores inflamatórios foram analisados através do teste de ANOVA, quando se obtiveram valores com diferença estatística significativa foi realizada comparação dois a dois utilizando o teste Tukey.^{97,98}

A análise dos resultados das culturas bacteriológicas foi realizada através da comparação das 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 da razão de verossimilhança, quando se obtiveram valores com diferença estatística significativa foi realizada comparação dois a dois utilizando o teste t de Student e o teste exato de Fisher.^{97,98}

A população bacteriana de cada tecido com cultura positiva foi avaliada de forma comparativa utilizando o teste de Kruskal-Wallis, quando se obtiveram valores com diferença estatística significativa foi realizada comparação dois a dois utilizando o teste de Dunn.^{97,98}

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 da razão de verossimilhança, quando se obtiveram valores com diferença

estatística significativa foi realizada comparação dois a dois utilizando o teste t de Student e o teste exato de Fisher.^{97,98}

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. Na análise da soma total do escore dos aspectos histológicos foi utilizado teste de análise de variância.^{97,98}

A mortalidade foi analisada através das curvas de Kaplan-Meier e comparadas utilizando os testes Log-rank e Gehan-Wilcoxon.^{97,98}

O nível de significância considerado para análise estatística foi de 0,05 para todos os resultados analisados, sendo utilizado o programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System*® e *Graphpad Prism*® versão 2.1.

3.11 - ASPECTOS ÉTICOS

Previamente ao início da execução deste projeto, o mesmo foi aprovado pelas Comissões de Ética do Departamento de Gastroenterologia e 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.*

4 – RESULTADOS

4.1 – ANÁLISE CLÍNICA

4.1.1 - Ascite

Não houve a formação de ascite no grupo Controle (Grupo I). Nos animais do grupo Pancreatite (Grupo II) houve um significativo aumento na formação de ascite ($p > 0,05$) e no grupo Indometacina (Grupo III) a formação de ascite apresentou redução estatisticamente significativa quando comparada ao grupo Pancreatite (Grupo II) (Tabela 3).

Tabela 3. Incidência de ascite por grupo, identificada 24 horas após a indução da PA.

Grupo	Ascite
Controle	0/10
Pancreatite	6/10*
Indometacina	3/10**

* $p < 0,05$ Pancreatite vs. Controle

** $p < 0,05$ Indometacina vs. Pancreatite

4.1.2 - Bloqueio peritoneal

Não houve formação de bloqueio peritoneal por alças intestinais e/ou pelo grande omento nos ratos do grupo Controle. O grupo Pancreatite apresentou bloqueio realizado por alças intestinais e pelo grande omento ao

redor do tecido pancreático em todos os animais estudados. O grupo Indometacina apresentou redução da ocorrência de bloqueio, mas sem significado estatístico (Tabela 4).

Tabela 4. Incidência de bloqueio na cavidade peritoneal por grupo, identificado 24 horas após a indução da PA.

Grupo	Bloqueio
Controle	0/10
Pancreatite	10/10*
Indometacina	9/10*

* $p > 0,05$ Pancreatite vs. Indometacina

4.1.3 - Peritonite

Não houve a ocorrência de qualquer processo inflamatório macroscópico na cavidade peritoneal dos animais do grupo Controle. Entretanto, no grupo Pancreatite houve a ocorrência de importante processo inflamatório na cavidade peritoneal, com predominância de peritonite localizada que acometia apenas o pâncreas e tecidos peri-pancreáticos contidos no andar superior do abdome.

Referente ao grupo Indometacina, a ocorrência de peritonite foi restrita ao pâncreas e tecidos peri-pancreáticos. A diferença entre o grupo Pancreatite comparado ao grupo Indometacina apresentou resultado com significância estatística com relação à ocorrência de peritonite generalizada (Tabela 5).

Tabela 5. Ocorrência de peritonite por grupo, identificada 24 horas após a indução da PA.

GRUPO	Peritonite		
	Ausente	Localizada	Generalizada
Controle	10/10	0/10	0/10
Pancreatite	0/10	6/10	4/10*
Indometacina	0/10	10/10	0/10*

* $p < 0,05$ Indometacina vs. Pancreatite

4.1.4 - Aspecto macroscópico do pâncreas

Avaliando o aspecto macroscópico do pâncreas todos os animais estudados do grupo Controle apresentavam pâncreas com aspecto normal. O grupo Pancreatite apresentou necrose pancreática na maioria dos animais estudados.

No grupo Indometacina houve uma distribuição semelhante entre a ocorrência de pancreatite edematosa e necrótica (Tabela 6).

Tabela 6. Aspecto macroscópico do pâncreas, observado 24 horas após a indução da PA.

GRUPO	Aspecto do Pâncreas			
	Normal	Edematoso	Necrótico	Necro-hemorrágico
Controle	10/10	0/10	0/10	0/10
Pancreatite	0/10	2/10	8/10	0/10
Indometacina	0/10	4/10	6/10	0/10

$p > 0,05$

4.2 – DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

O grupo controle não apresentou elevação do nível sérico das interleucinas 6 e 10, duas horas após a realização do procedimento cirúrgico. Houve elevação significativa das interleucinas no grupo Pancreatite quando comparadas ao grupo Controle.

Os animais do grupo Indometacina apresentaram significativa redução dos níveis de IL-6 e IL-10 expressos em pg/ml e coletadas duas horas após a indução da PA quando comparados ao grupo Pancreatite (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Níveis séricos de IL-6 duas horas após a indução da PA – $p < 0,05$ Pancreatite vs. Indometacina.

Figura 4. Níveis séricos de IL-10 duas horas após a indução da PA – $p < 0,05$ Pancreatite vs. Indometacina.

Após a indução da PA, o grupo Pancreatite apresentou importante elevação da PGE2 circulante. Houve significativa redução dos níveis de PGE2 expressos em pg/ml do grupo Indometacina quando comparado ao grupo Pancreatite (Figura 5)

Figura 5. Níveis séricos de PGE2 duas horas após a indução da PA – $p < 0,01$ Pancreatite vs. Indometacina.

4.3 - ESTUDO MICROBIOLÓGICO – TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

4.3.1 – Pâncreas

Não houve crescimento bacteriano em todas as culturas de tecido pancreático realizadas do grupo Controle. Ocorreu crescimento bacteriano em nove dos dez ratos estudados do grupo Pancreatite, com aumento estatisticamente significativo da população bacteriana expressa em UFC/g quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$).

Os animais do grupo Indometacina apresentaram oito culturas positivas, não ocorrendo redução estatisticamente significativa do número de culturas positivas (Figura 6).

Figura 6. Culturas positivas no tecido pancreático – $p > 0,05$ Pancreatite vs. Indometacina.

Houve redução significativa da população de bactérias expressas em UFC/g do grupo Indometacina quando comparado ao grupo Pancreatite, onde se notou a ocorrência de redução do número total de bactérias no pâncreas

durante episódio de pancreatite aguda após a administração de Indometacina (Tabela 7).

Tabela 7. Valores correspondem à população bacteriana expressa em UFC/g x 10⁵ no pâncreas.

Pâncreas			
	Controle	Pancreatite *	Indometacina **
Rato 1	0	0,50	2,80
Rato 2	0	2,30	0,09
Rato 3	0	0,20	0,02
Rato 4	0	1,50	1,20
Rato 5	0	1,10	0
Rato 6	0	3	1,4
Rato 7	0	0,20	0,04
Rato 8	0	0	0,15
Rato 9	0	2,50	0
Rato 10	0	1,50	0,30

* p < 0,05 Pancreatite vs. Controle

** p < 0,05 Indometacina vs. Pancreatite

4.3.2 – Linfonodos mesentéricos

O grupo Controle não apresentou crescimento bacteriano nas culturas de linfonodos mesentéricos. Houve aumento estatisticamente significativo no número de culturas positivas nos ratos submetidos a pancreatite aguda (grupo Pancreatite) (p<0,05).

O grupo Indometacina não apresentou redução significativa do número de culturas positivas quando comparado ao grupo Pancreatite (Figura 7).

Figura 7. Culturas positivas nos linfonodos mesentéricos após a indução de PA - $p > 0,05$ Pancreatite vs Indometacina.

Não se observou diferença significativa da população bacteriana expressa em UFC/g das culturas positivas dos grupos Pancreatite e Indometacina (Tabela 8).

Tabela 8. Valores correspondem à população bacteriana expressa em UFC/g x 10^5 nos linfonodos mesentéricos.

Linfonodos			
	Controle	Pancreatite	Indometacina
Rato 1	0	0,14	0
Rato 2	0	0,02	0,30
Rato 3	0	0,34	0
Rato 4	0	0,02	1,60
Rato 5	0	0	0,08
Rato 6	0	0	0,15
Rato 7	0	0,30	0,30
Rato 8	0	0,90	0,15
Rato 9	0	0,50	0
Rato 10	0	1,20	0

$p > 0,05$ Pancreatite vs Indometacina

4.3.3 – Fígado

O grupo Controle não apresentou crescimento bacteriano nas culturas de tecido hepático. O grupo submetido à PA (Grupo Pancreatite) apresentou elevação estatisticamente significativa do número de culturas positivas realizadas no tecido hepático ($p < 0,05$).

Os animais que receberam a administração de indometacina (Grupo Indometacina) não apresentaram redução do número de culturas positivas (Figura 8).

Figura 8. Culturas positivas do tecido hepático após a indução de PA - $p > 0,05$ Pancreatite vs Indometacina.

O grupo Indometacina manteve o mesmo padrão de crescimento bacteriano, comparado ao grupo Pancreatite e não se verificando alteração do número total de bactérias após a administração de indometacina (Tabela 9).

Tabela 9. Valores correspondem à população bacteriana expressa em UFC/g x 10⁵ no tecido hepático.

Fígado			
	Controle	Pancreatite	Indometacina
Rato 1	0	0,02	0
Rato 2	0	0	1,10
Rato 3	0	0	0
Rato 4	0	0,13	0
Rato 5	0	0	0,03
Rato 6	0	0	0,01
Rato 7	0	0,01	0,16
Rato 8	0	0	0,16
Rato 9	0	1,20	0,12
Rato 10	0	0,60	0

p > 0,05 Pancreatite vs Indometacina

4.3.4 – Sangue

Não ocorreram culturas positivas no grupo Controle. Os grupos Pancreatite e grupo Indometacina apresentaram aumento estatisticamente significativo do número de hemoculturas positivas ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística entre ambos os grupos (Figura 9).

Figura 9. Hemoculturas positivas após a indução de PA - $p > 0,05$ Pancreatite vs Indometacina.

4.3.5 – Cavidade peritoneal

Não foram observadas culturas positivas no grupo Controle. Os grupos Pancreatite e grupo Indometacina apresentaram significativo aumento do número de culturas positivas ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística entre ambos os grupos (Figura 10).

Figura 10. Culturas positivas da cavidade peritoneal após a indução de PA - $p > 0,05$ Pancreatite vs Indometacina.

4.4 - ESTUDO MICROBIOLÓGICO – INFECÇÃO

4.4.1 – Pâncreas

Não se observou a ocorrência de infecção pancreática no grupo Controle. Os animais submetidos a pancreatite aguda (Grupo Pancreatite) apresentaram elevada incidência de infecção pancreática (60%), valor estatisticamente superior quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$).

O grupo Indometacina apresentou significativa redução da ocorrência de infecção pancreática quando comparado ao grupo Pancreatite (Figura 11).

Figura 11. Valores correspondem à ocorrência de infecção pancreática - * $p < 0,05$ Pancreatite vs Indometacina.

4.4.2 – Linfonodos mesentéricos

Não houve infecção nos linfonodos mesentéricos do grupo Controle. O aumento da ocorrência de infecção nos grupos Pancreatite e Indometacina, no entanto não foi estatisticamente significante (Figura 12).

Figura 12. Valores correspondem à ocorrência de infecção nos linfonodos mesentéricos - $p > 0,05$ Pancreatite vs Controle Pancreatite vs Indometacina.

4.4.3 – Fígado

Não houve infecção no tecido hepático no grupo Controle. O aumento na ocorrência de infecção nos grupos Pancreatite e Indometacina não foi estatisticamente significativo (Figura 13).

Figura 13. Valores correspondem à ocorrência de infecção no tecido hepático –
 $p > 0,05$ Pancreatite vs Controle Pancreatite vs Indometacina.

4.5 - ESTUDO MICROBIOLÓGICO – QUALITATIVO

Houve o predomínio de bactérias gram negativas nas culturas de todos os tecidos analisados dos grupos Pancreatite e Indometacina. A administração de indometacina não alterou a flora bacteriana, sendo observada a mesma distribuição em ambos os grupos.

As figuras 14 e 15 representam as principais bactérias identificadas no pâncreas nos grupo Pancreatite e Indometacina respectivamente.

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

Figura 14. Distribuição percentual das bactérias identificadas no grupo Pancreatite

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

Figura 15. Distribuição percentual das bactérias identificadas no grupo Indometacina

4.6 - ASPECTOS HISTOLÓGICOS

4.6.1 - Avaliação histológica do pâncreas

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 16).

Os valores médios do escore proposto por Schmidt J. et al.⁹⁵ para classificação histológica da gravidade da pancreatite aguda experimental estão representados na Figura 17 e correspondem à análise dos grupos Controle, Pancreatite e Indometacina respectivamente.

Não houve redução significativa do escore médio dos itens propostos para avaliação da gravidade da pancreatite aguda dos animais que receberam Indometacina quando comparados aos animais que sofreram apenas a indução da pancreatite aguda.

Figura 16. 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).

Figura 17. Achados histológicos 24 hs após a indução da pancreatite aguda.

Asteriscos indicam Aumento significativo da gravidade do processo inflamatório dos grupos Pancreatite e Indometacina comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$)

4.6.2 – Avaliação histológica do intestino

Os grupos Pancreatite e Indometacina apresentaram significativo aumento na ocorrência de inflamação da mucosa intestinal quando comparados com o grupo Controle. A administração de indometacina não foi capaz de reduzir a ocorrência ou intensidade da inflamação na mucosa intestinal quando realizada comparação entre o grupo Indometacina e Pancreatite (Figura 18).

Não foi observada a presença de qualquer lesão erosiva ou ulcerada da mucosa intestinal do grupo Indometacina.

Figura 18. Valores correspondentes ao grau de inflamação na mucosa intestinal observado em cada um dos animais dos grupos analisados, distribuídos de acordo com o grau de inflamação – $p > 0,05$ Pancreatite vs Indometacina.

4.6.3 – Avaliação histológica dos linfonodos mesentéricos

Houve importante aumento da ocorrência de hiperplasia folicular e sinusal nos grupos Pancreatite e Indometacina quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$).

Não houve redução estatisticamente significativa entre a ocorrência de hiperplasia folicular e hiperplasia sinusal entre os dados referentes aos grupos Pancreatite e Indometacina.

4.6.4 – Avaliação histológica do fígado

No grupo Controle não foi observada a ocorrência de inflamação do espaço porta, inflamação do lóbulo hepático, ocorrência de necrose hepática ou hiperplasia das células de Kupffer.

Os grupo Pancreatite e Indometacina apresentaram aumento estatisticamente significativo na ocorrência de hiperplasia das células de Kupffer quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$). Não houve a ocorrência de inflamação portal ou lobular e a ocorrência de necrose hepática nos referidos grupos.

4.7 - MORTALIDADE

Não houve mortalidade no grupo Controle. O grupo Pancreatite apresentou taxa de mortalidade de 33%, valores estes semelhantes aos encontrados na literatura. O grupo Indometacina apresentou 28% de taxa de

mortalidade, não havendo redução estatisticamente significativa entre os grupos Pancreatite e Indometacina ($p>0,05$).

Não foram encontradas diferenças entre as curvas de sobrevida dos animais que receberam Indometacina, quando comparados aos animais com pancreatite aguda (Figura 19) ($p>0,05$).

Figura 19. Comparação entre as curvas de sobrevida dos respectivos grupos – $p>0,05$ Pancreatite e Indometacina.

5 – DISCUSSÃO

A administração de indometacina nas situações propostas por este estudo experimental provocou alterações significativas nos animais portadores de pancreatite grave que devem ser ressaltadas. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado um possível efeito benéfico do uso de antiinflamatórios na redução da infecção pancreática.

Os achados clínicos e operatórios dos pacientes com pancreatite aguda podem sugerir a evolução da doença e determinar o tratamento a ser utilizado. O aparecimento de desconforto e insuficiência respiratória, alteração e instabilidade hemodinâmica e alteração do débito urinário são fenômenos comuns nos pacientes com pancreatite aguda grave e indicam uma evolução desfavorável com altos índices de morbidade e mortalidade.^{2,6,9,10,15,18,24,34,35}

A melhora de alguns aspectos clínicos observada após a administração de indometacina (Tabelas 3 e 5) estaria diretamente relacionada com uma possível melhora do prognóstico, o que no entanto não se traduziu em redução da mortalidade (Figura 19), demonstrando o envolvimento de múltiplos fatores na evolução da PA.

Para a realização do estudo da translocação bacteriana se faz necessária a 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.^{40,41}

A ausência de crescimento bacteriano no grupo Controle demonstrou a eficácia do método utilizado. Não foi observada a presença de bactérias em todos os tecidos analisados do grupo Controle. Entretanto, os grupos Pancreatite e Indometacina apresentaram culturas positivas nos tecidos analisados o que determina a relação entre a pancreatite aguda e 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 sugerem como três as possíveis vias de disseminação das bactérias durante a translocação bacteriana: via linfática – linfonodos mesentéricos, hematogênica – corrente sanguínea e transmural - cavidade peritoneal.^{41,43,44,49,50,52} 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} Indivíduos saudáveis apresentam a translocação de forma contínua, ocorrendo em pequena intensidade, sendo os microorganismos contidos e eliminados pela barreira mucosa gastrointestinal, não permitindo assim a ocorrência de qualquer repercussão. No segundo

estágio, 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 estágio se caracteriza pelo acometimento sistêmico e pela ocorrência de infecções associadas e quadros sépticos.^{43,45,56}

No presente estudo não foram obtidos resultados semelhantes aos observados em estudos prévios que demonstraram ser a indometacina capaz de reduzir a translocação bacteriana em modelos experimentais de grandes queimados.^{69,70} Tais resultados se devem provavelmente à maior complexidade da doença pancreatite aguda quando comparada a um grande queimado, uma vez que além do processo inflamatório sistêmico estão envolvidos na PA a ocorrência de ascite, íleo adinâmico, peritonite e distensão de alças intestinais.

Nos últimos anos houve um grande esforço na tentativa de esclarecer as causas da infecção do tecido pancreático necrótico durante o evento pancreatite aguda. A maioria dos estudos realizados apontou para a translocação bacteriana como sendo a responsável pela contaminação do tecido pancreático e conseqüente início de um processo infeccioso com conseqüências devastadoras para a evolução e o prognóstico da doença.^{3,4,36,39-45,56}

Outros fatores são descritos como eventuais responsáveis pela ocorrência da infecção do tecido pancreático, tais como, colocação de cateter central, manipulação diagnóstica e uso de nutrição parenteral.^{4,6,8,10} O

presente estudo suporta a hipótese da translocação bacteriana como principal responsável pela ocorrência de infecção pancreática, pois demonstrou a ocorrência de infecção na ausência de todos os procedimentos acima descritos, sendo desta forma a infecção pancreática neste modelo experimental atribuída à translocação bacteriana.

As bactérias isoladas no pâncreas mantiveram o mesmo padrão observado em trabalhos anteriores, com predomínio de bactérias gram negativas.^{40,41} Alguns trabalhos sugerem a alteração dos microorganismos causadores da infecção pancreática após o uso de antibióticoterapia profilática e existem ainda descrições do aumento de infecções causadas por bactérias gram positivas e eventualmente infecções fúngicas após o uso de Imipenem.^{3,4,5,6,19,37,47} No presente estudo, o uso de indometacina não alterou a flora bacteriana responsável pela infecção pancreática.

Uma série de trabalhos relaciona a ocorrência de úlceras da mucosa intestinal com o uso de elevadas doses de indometacina.^{70,91,99} Foi utilizada neste trabalho uma dose previamente determinada em estudo preliminar por nós realizado e não relacionada com o desenvolvimento de tais lesões.^{70,91} O processo inflamatório observado na parede intestinal, como a presença e intensidade do infiltrado linfocitário, manteve o mesmo padrão nos grupos Pancreatite e Indometacina e não foi descrita a ocorrência de ulcerações intestinais. Desta forma o uso da indometacina não causou alteração do processo inflamatório ou lesões da mucosa intestinal no presente estudo.

A ausência de tais ulcerações no grupo indometacina afasta possíveis questionamentos relacionados ao efeito desta droga como fator facilitador da ocorrência de translocação bacteriana.

Além disso, os dados obtidos neste trabalho, referentes à redução da população bacteriana no tecido pancreático após o uso de indometacina, sugerem como verdadeira a hipótese de que níveis elevados de prostaglandinas teriam uma ação direta sobre os macrófagos reduzindo sua ação bactericida, permitindo desta forma a ocorrência de maior acúmulo bacteriano no tecido pancreático e conseqüente maior incidência de infecção pancreática. ^{70,75-80}

Foi demonstrado em trabalho anterior realizado por Souza et al ⁴¹ a associação da hiperplasia da célula de Kupffer e o fenômeno translocação bacteriana. ⁴¹ Esta relação, novamente demonstrada neste trabalho, sugere uma eventual resposta do sistema imune na tentativa de conter a translocação bacteriana. De fato, as células de Kupffer representam aproximadamente 70% da população de macrófagos do corpo e possuem importante papel na resposta inflamatória e imunológica sistêmica. ^{41,45}

Analisando os aspectos histológicos observou-se que o grau de inflamação presente no tecido pancreático não foi alterado com a administração de indometacina. Desta forma a administração desta droga não foi capaz de interferir no grau de inflamação e lesão do tecido pancreático.

A pancreatite aguda grave com necrose e infecção pancreática possui elevados índices de mortalidade, quando associada à insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (IMOS) pode apresentar índice de mortalidade que se

aproxima 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 insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas se caracteriza pela perda funcional de três ou mais órgãos e sistemas e constitui a principal causa de morte em pacientes com pancreatite aguda grave internados em unidade de terapia intensiva.^{11,23,27} Este fenômeno pode estar associado à sepse desencadeada pela infecção pancreática ou ocorrer mesmo na ausência de qualquer evento infeccioso.^{23,29,31}

A seqüência dos eventos inflamação sistêmica, IMOS, falência da barreira mucosa, translocação bacteriana, infecção e sepse são atualmente a seqüência mais aceita para explicar a ocorrência de quadros infecciosos e sepse em situações clínicas como a PA, choque hemorrágico e grandes queimados.^{8,9,13,26,28,33}

O evento inflamatório presente na pancreatite aguda foi 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, proteína C reativa, TNF- α e prostaglandina E2.^{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.^{22,26-28,31,32} A intensidade da resposta inflamatória é traduzida pelos altos níveis de citocinas circulantes, sendo a intensidade da resposta inflamatória fator determinante na ocorrência de eventos como a IMOS, a translocação bacteriana e indiretamente a ocorrência de infecção pancreática.²⁶⁻²⁸

O uso de indometacina nas condições descritas neste trabalho resultou em diminuição das dosagens séricas de interleucinas 6 e 10 e prostaglandina E2, resultados que confirmam a diminuição na intensidade da resposta inflamatória sistêmica após a administração de indometacina, permitindo a observação da existência de relação direta entre os níveis destes mediadores inflamatórios e a ocorrência de infecção pancreática.

Os resultados obtidos neste trabalho referentes à redução da população bacteriana no tecido pancreático e da ocorrência de infecção pancreática podem ser justificados pela redução dos níveis de IL-6 e PGE2, uma vez que foi demonstrada a importante ação da IL-6 na disfunção da barreira mucosa permitindo a ocorrência da translocação bacteriana^{31-33,73} e foi demonstrado que elevados níveis de PGE2 são capazes de provocar a inibição da expressão de antígenos de superfície em macrófagos, causando desta uma importante deficiência na função macrofágica e permitindo assim que as bactérias intestinais sejam carregadas e disseminadas por macrófagos defectives, tornando possível a ocorrência de translocação bacteriana.^{70,75-80}

A disfunção da barreira intestinal está associada à SRIS, tendo sido anteriormente demonstrado que níveis elevados de IL-6 causam alteração significativa da circulação mesentérica e da integridade da barreira mucosa

intestinal. Este efeito se deve à liberação de substâncias vasoativas e depressoras do miocárdio responsáveis pela ocorrência de baixo fluxo mesentérico e isquemia intestinal, favorecendo assim a translocação bacteriana.^{13,28} Disfunção da barreira intestinal tem sido considerada como uma das possíveis insuficiências de múltiplos órgãos e sistemas associadas à PA, assim como insuficiência renal e insuficiência respiratória.^{13,29,33}

A relação direta entre o nível sérico da PGE2 e a incidência de infecção pancreática observada neste estudo confirma a teoria de participação dos macrófagos na translocação bacteriana em inflamações sistêmicas graves e a importância dos níveis de prostaglandina no favorecimento da ocorrência de infecção pancreática proposta neste estudo.

A administração de indometacina foi capaz de diminuir a ocorrência de infecção pancreática, mas não foi capaz de reduzir a intensidade do processo inflamatório observado no tecido pancreático e a mortalidade observada neste modelo experimental.

Desta forma a não redução da mortalidade após a administração da indometacina poderia ser atribuída à importância do processo inflamatório no tecido pancreático e o desenvolvimento de complicações sistêmicas, tais como insuficiência respiratória e hipotensão, no desenvolvimento da mortalidade precoce na pancreatite aguda e não apenas ao evento infecção pancreática, responsável em geral pela ocorrência de mortalidade tardia.

Com efeito a análise da figura 19, referente à mortalidade, pode-se observar que a grande maioria dos animais faleceu nas primeiras 24 hs após a indução da PA em decorrência de prováveis alterações sistêmicas relacionadas

à doença, tais como hipotensão e insuficiência respiratória. Desta maneira, seria possível que a utilização de medidas de suporte, tais como reposição volêmica e suporte ventilatório, associadas ao uso da indometacina levariam à melhora das condições clínicas iniciais permitindo assim reduzir a mortalidade da PA, uma vez que a principal causa de óbito na segunda fase da PA se deve a infecção do tecido pancreático.^{2,3,51,52}

O aspecto mais significativo deste estudo foi ter demonstrado a relação entre processo inflamatório sistêmico, translocação bacteriana e infecção pancreática, uma vez que foi observado um possível efeito benéfico do uso de antiinflamatórios na redução da liberação de citocinas e da ocorrência de infecção pancreática, estimulando assim a realização de novos ensaios experimentais e clínicos.

Os resultados deste estudo apontam para uma nova possibilidade terapêutica no sentido de reduzir a infecção pancreática e suas complicações possibilitando desta forma a redução da mortalidade associada à pancreatite aguda.

6 – CONCLUSÕES

O presente estudo realizado nas condições descritas permitiu as seguintes conclusões:

1. A pancreatite aguda foi, neste modelo experimental, responsável pela ocorrência de translocação bacteriana;
2. A translocação bacteriana é o principal evento responsável pela colonização e conseqüente infecção do tecido pancreático;
3. A administração de indometacina causou diminuição da resposta inflamatória sistêmica ao evento pancreatite aguda, demonstrado pela redução dos níveis de IL-6, IL-10 e PGE2;
4. A indometacina foi capaz de reduzir a população bacteriana presente no pâncreas com inflamação e a incidência de infecção pancreática;
5. A administração de indometacina não alterou a curva de sobrevida e os índices de mortalidade dos animais com pancreatite aguda.

7 – 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. Bassi C. Infections in pancreatic inflammatory disease: Clinical trials for antibiotic prophylaxis. *Pancreatology* 2001; 1:210-212.
6. Uhl 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, Buchler MW. IAP Guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 2: 565-73.
7. 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.
8. Hartwing W, Werner J, Uhl W, Buchler MW. Management of infection in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9:423-8.
9. Clancy TE, Asheley SW. Current management of necrotizing pancreatitis. *Adv Surg* 2002; 36:103-21.
10. Liu TH, Kwong KL, Tammm 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.

11. Wang H, Li WQ, Zhou W, Li N, Li JS. Clinical effects of continuous high volume hemofiltration on severe acute pancreatitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2096-9.
12. Beattie GC, Mason J, Swan D, Madhavan KK, Siriwardena AK. Outcome of necrosectomy in acute pancreatitis: the case for continued vigilance. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:1449-53.
13. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21: 130-5.
14. Coelho AMM, Machado MCC, Cunha JEM, Sampietre SM, Abdo EE. Influence of pancreatic enzyme content on experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26:230-34.
15. 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.
16. Bassi C, Butturini G, Falconi M, Salvia R, Frigerio I, Pederzoli P. Outcome of open necrosectomy in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 128-32.

17. 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.
18. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. J Clin Gastroenterol 2000; 30: 343-56.
19. Renner JG, Savage III WT, Pantoja JL. Death due to acute pancreatitis: a retrospective analysis of 405 autopsy cases. Dig Dis Sci 1985; 30:1005-18.
20. 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.
21. 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.
22. Bettinger JR, Grendell JH. Intracellular events in the pathogenesis of acute pancreatitis. Pancreas 1991;6:2-6.

23. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190:117-125.
24. 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.
25. 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.
26. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Invest Drugs* 2001; 2:496-501.
27. Riche FC, Cholley BP, Laisne MJ, Vicaut 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.
28. Makhija R, Kingsnorth NA. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 401-10.

29. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth NA. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82:6-13.
30. 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.
31. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175:76-83.
32. Brivet FG, Emilie D. Predictive value of cytokines during acute severe pancreatitis. *Crit Care Med* 2000; 28:2673.
33. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiology implications. *Gut* 2000; 47:546-552.
34. Alves Junior A, Coelho AMM, Sampietre SN, Kubrusly MS, Molan NAT, Machado MCC. Lesão pulmonar na pancreatite aguda. Influência da redução do conteúdo enzimático do pâncreas. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1996; 51(2):37-43.

35. 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.
36. Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KKW. Pathogenesis of pancreatic sepsis. Am J Surg 1993; 165:46-51.
37. McClave SA, McAllister EW, Karl RC. Pancreatic abscess: ten years experience at the University of South Florida. Am J Gastroenterol 1986; 81:180.
38. 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.
39. 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.
40. 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.

41. 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 Gastro Surg* 2001; 5:364-70.
42. 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.
43. 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.
44. Thomson A. Bacterial translocation in acute pancreatitis. *J gastroenterol Haepatol* 2003; 18: 1214.
45. Macintire DK, Bellhorn TL. Bacterial translocation: clinical implications and prevention. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 1165-78.
46. 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.

47. Akoyl S, Mas MR, Comert B, Ateskan U, Yasar M, Aydogan H, Deveci S, Akay C, Mas N, Yener N, Kocar IH. The effect of antibiotic and probiotic combination therapy on secondary pancreatic infections and oxidative stress parameters in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 363-7.
48. 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.
49. Tarpila E, Nystrom PO, Frazem L. Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg* 1993; 159:109-13.
50. Isenmann R, Beger HG. Bacterial infection of pancreatic necrosis: Role of bacterial translocation, impact of antibiotic treatment. *Pancreatology* 2001; 1:79-89.
51. Reber HA. Pathogenesis of infection in pancreatic inflammatory disease. *Pancreatology* 2001; 1:207-209.
52. Foitzik T. The enteral factor in pancreatic infection. *Pancreatology* 2001; 1:217-223.

53. Juvonen PO, Alhava EM, Takala JA. Gut permeability in patients with acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 12:1314-1318.
54. 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.
55. Wells CL. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplant Proc.* 1996; 28:2653-6
56. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23:217-44.
57. Newark NJ. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery* 2002; 131: 241-244.
58. 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.
59. Wang XD, Andersson R. Intestinal brush border membrane function. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 289-99.

60. 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.
61. Wang X, Gong Z, Wu K, Wang B, Yuang Y. Gastrointestinal dysmotility in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 57-62.
62. Fukushima R, Alexander JW, Gianotti L, Pyles T, Ogle CK. Bacterial translocation-related mortality may be associated with neutrophil-mediated organ damage. *Shock* 1995; 3:323-8.
63. 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.
64. 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.
65. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. *Arch Surg* 1987; 122:48-53.

-
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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
70. 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.
71. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/TNF (Tumor Necrosis Factor). *Lancet* 1989; 1: 1122-26.

72. Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz EM, Duseti 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.
73. 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.
74. 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.
75. Bhatia M, Proudfoot AE, Wells TN, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with Met-RANTES reduces lung injury in cerulein-induced pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90:698-704.
76. 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.

77. Foitzik T, Hotz HG, Hotz B, Wittig F, Buhr HJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequel in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50:1159-62.
78. Song Am, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GS, Steer ML, Saluja Ak. Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:1166-74.
79. Ethridge RT, Chung DH, Slogoff M, Ehlers RA, Hellmich MR, Rajaraman S, Saito H, Uchida T, Evers BM. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 2002; 123:1311-22.
80. Yucel K, Alhan E, Kucuktulu U, Piri M, Ercin C, Deger O. The effects of prostaglandin E1 on the microperfusion of the pancreas during acute necrotizing pancreatitis in rats. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:544-8.
81. Kiviniemi H, Ramo OJ, Stahlberg M, Kairaluoma F. Indomethacin in canine acute hemorrhagic pancreatitis. *Res Exp Med* 1988; 188:35-40.

82. Coelle EF, Adham N, Elashoff J, Lewin K, Taylor IL. Effects of prostaglandin and indomethacin on diet-induced acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 1983; 5:1307-12.
83. Studley JG, Lee JB, Schenk WG Jr. Effects of indomethacin on blood flow in the normal pancreas in conscious dogs. *J Surg Res* 1984; 37: 464-6.
84. Wildenhain PM, Melhem MF, Birsic WI, Sell HW, Rao KN. Acute hemorrhagic pancreatitis in mice: improved survival after indomethacin administration. *Digestion* 1989; 44:41-51.
85. Puluszezak D, Bianchi A, Cazin JC, Cazin M. Indomethacin distribution in acute pharmacological response among rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1991; 13:419-425.
86. Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Experimental model of acute pancreatitis. *British J Surgery* 1994; 81:1096-1103.
87. Rattner DW. Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 219; 6-9.

88. Tarpila E, Nyström PO, Frazém L, Lija I, Ihse I. Acute experimental suppurative pancreatitis in the rats. *Acta Chir Scand* 1988; 154: 379-383.
89. Lankisch PG, Koop H, Winckler K, Kunze H, Vogt W. Indomethacin treatment of acute experimental pancreatitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13:629-33.
90. Goodman & Gilman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10th edition 2001 McGrall-Hill.
91. Kalns JE, Millenbaugh NJ, Wientjes MG, Au JLS. Design and analysis of in vitro antitumor pharmacodynamic studies. *Cancer Research* 1995; 55: 5315-5322.
92. 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.
93. Murray PR, Jo Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7º ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1999.
94. Murray PR, Jo Baron E. *Manual of Clinical Microbiology*. 8º ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 2001.

95. 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 Gastroenterology* 1992; 215:44-56.
96. Manenti A, Botticelli L, Bertoli R, Martinelli AM, Botticelli AR. Experimental acute infectious pancreatitis in rats: histological observations. *Pathologica* 1996; 88:286-90.
97. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. 1º ed. Londres, Chapman & Hall, 1991.
98. Numro BH. *Statistical methods for health care research*. 4º ed. Portland, Lippincott, 2001.
99. Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi K. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res* 1999; 40: 517-24.