ANA MARIA DE MENDONÇA COELHO

**Mecanismos de ação da solução salina hipertônica
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: Cirurgia do Aparelho
Digestivo

Orientador: Prof. Dr. José Jukemura

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coelho, Ana Maria de Mendonça

Mecanismos de ação da solução salina hipertônica na pancreatite aguda experimental / Ana Maria de Mendonça Coelho. -- São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: José Jukemura.

Descritores: 1.Pancreatite 2.Solução salina hipertônica 3.Inflamação
4.Citocinas 5.SIRS

USP/FM/SBD-112/10

Dedicatória

À memória dos meus pais Maria de Lourdes e Antonio, sempre presente.

Aos meus irmãos Maria Cecília, Antonio Luis, Paulo Fernando e Carlos Henrique, pelo carinho, apoio e grande amizade.

Às minhas queridas e amadas sobrinhas Natália e Helena, pela alegria que me trazem.

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado pelo privilégio de tê-lo como mestre durante estes 25 anos. Agradeço por seus ensinamentos, incentivo, apoio e amizade, transmitindo-me confiança e possibilitando meu crescimento profissional e pessoal. Sua determinação, sua atuação profissional e seu constante espírito científico são grandes exemplos em minha vida. A ele, meu respeito e admiração.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Jukemura pelo seu apoio, incentivo, amizade e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha pela amizade durante todos estes anos, pelos ensinamentos, incentivo e sugestões.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque pela confiança depositada no meu trabalho e apoio nas pesquisas desenvolvidas no LIM/37.

Ao Prof. Dr. Ivan Cecconello pelo estímulo no desenvolvimento desta tese.

À amiga Sandra Nassa Sampietre por todos estes anos de agradável convívio e pela colaboração técnica durante todas as etapas da realização deste projeto.

À amiga Nilza A. Trindade Molan pelo apoio e auxílio na realização deste estudo.

À Dra. Rosely Antunes Patzina pela colaboração na realização dos estudos histológicos.

Ao Dr. Björn Lindkvist do Departamento de Cirurgia da Universidade de Malmö, Suécia, pela realização das dosagens dos peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP).

À Profa. Dra. Sonia Jancar e ao Dr. Joilson O. Martins do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP,

pela colaboração na complementação das dosagens dos mediadores inflamatórios e na elaboração do artigo científico.

Ao Dr. Tércio de Campos e ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza pelo apoio e pelas sugestões propostas no exame de qualificação.

À amiga Dra. Yara Gonzalez com quem iniciei trabalhos de pesquisa na área de fisiopatologia pancreática e em análise estatística e interpretação de dados, que foram fundamentais para minha formação e raciocínio no campo da pesquisa científica.

Aos amigos Dr. Lourenilson José de Souza e Márcia Saldanha Kubrusly pelo apoio e pela amizade durante todos estes anos.

Aos amigos do Serviço de Cirurgia do Pâncreas e Vias Biliares, Prof Dr. Telesforo Bacchella, Dr. Emilio Elias Abdo, Dra. Sonia Penteado, Dr. André Montagnini e Dr. André Siqueira Matheus pelo incentivo e apoio na realização deste projeto.

À amiga Mariana Raslan Paes-Barbosa por suas sugestões e pelo agradável convívio nestes três anos de pós-graduação.

Às secretárias Vilma de Jesus Liberio, Myrtes Freire de Lima Graça e Mariliza Ottani Fernandes pela atenção, disponibilidade e paciência.

À D. Maria Aparecida Eduardo pela amizade de tantos anos.

A todos os funcionários e amigos do Laboratório de Investigação Médica (LIM/37) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio à Pesquisa

O desenvolvimento deste trabalho contou com o suporte financeiro oferecido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 07/03980-5.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	11
3. MÉTODOS.....	13
3.1 Aspectos éticos.....	14
3.2 Animais de experimentação.....	15
3.3 Delineamento experimental.....	15
3.4 Indução da pancreatite.....	18
3.5 Coleta de materiais.....	20
3.6 Determinação do volume de líquido ascítico.....	21
3.7 Dosagem de peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio.....	21
3.8 Dosagem de amilase.....	22
3.9 Avaliação da peroxidação lipídica.....	22
3.10 Análise histológica do tecido pancreático.....	22
3.11 Dosagem da mieloperoxidase pancreática.....	25
3.12 Dosagem dos mediadores inflamatórios.....	26
3.13 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Avaliação da lesão pancreática.....	29
4.1.1 Peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio.....	29
4.1.2 Amilase.....	32
4.1.3 Peroxidação lipídica.....	35

4.1.4 Análise histológica do tecido pancreático.....	37
4.2 Avaliação da resposta inflamatória sistêmica.....	39
4.2.1 Volume de líquido ascítico.....	39
4.2.2 Mediadores inflamatórios no líquido ascítico e soro.....	40
4.3 Avaliação da resposta inflamatória local.....	48
4.3.1 Mediadores inflamatórios no tecido pancreático.....	48
4.3.2 Relação IL-10/TNF- α no tecido pancreático.....	54
4.3.3 Relação IL-10/IL-6 no tecido pancreático.....	56
4.3.4 Mieloperoxidase pancreática.....	58
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÕES.....	69
7. ANEXOS.....	71
8. REFERÊNCIAS.....	91

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	micromolar
<	menor que
$\pm$	mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
g	grama
Hz	hertz
Kg	kilograma
L	litro
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
nM	nanomolar
pg	picograma
rpm	rotações por minuto
U	unidade

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	controle
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COX	ciclooxigenase
DO	densidade óptica
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio imunoenzimático
EPM	erro padrão da média
EROS	espécies reativas de oxigênio
et al.	e outros
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL	interleucina
IMOS	insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	malondialdeído
MPO	mieloperoxidase
NF- κ B	fator de ativação nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
PA	pancreatite aguda
PAF	fator de ativação plaquetária
PBS	tampão fosfato salina
PGE2	prostaglandina E2
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SSF	solução salina fisiológica
SSH	solução salina hipertônica
ST	sem tratamento

TA	tripsinogênio aniônico
TAP	peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	tripsinogênio catiônico
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

COELHO, AMM. *Mecanismos de ação da solução salina hipertônica na pancreatite aguda experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 104p.

INTRODUÇÃO: A pancreatite aguda (PA) grave é um processo inflamatório do pâncreas caracterizado por alterações hemodinâmicas e resposta inflamatória sistêmica com altos níveis de mortalidade. A ativação inapropriada intrapancreática das enzimas pancreáticas desempenha papel importante no desencadeamento dos mecanismos inflamatórios responsáveis pelas manifestações locais e sistêmicas da doença. Em trabalho anterior observamos redução significativa da mortalidade após administração de solução salina hipertônica em ratos, através de redução das alterações hemodinâmicas e da resposta inflamatória sistêmica, mas os efeitos da solução salina hipertônica na ativação das enzimas pancreáticas e na própria lesão pancreática não foram estudados. O objetivo deste estudo foi avaliar se o mecanismo de ação da solução salina hipertônica, reduzindo a gravidade da pancreatite aguda em ratos, ocorre devido à redução da intensidade da lesão pancreática e/ou à redução da resposta inflamatória sistêmica e seus efeitos. **MÉTODOS:** Foi utilizado um modelo experimental de pancreatite aguda grave através da injeção intraductal de taurocolato de sódio a 2,5%. Cento e quarenta e dois ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: Controle (animais que não foram submetidos à indução da PA), Grupo ST (animais que não receberam tratamento após a indução da PA), Grupo SSF (animais que receberam 34ml/Kg de solução salina fisiológica de NaCl 0,9% por via endovenosa, 1 hora após a indução da PA) e grupo SSH (animais que receberam 4ml/Kg de solução salina hipertônica de NaCl 7,5% por via endovenosa, 1 hora após a indução da PA). Após 2, 12 e 24 horas da indução da PA os animais foram

sacrificados e os materiais foram coletados para análise. Foram efetuadas a quantificação do volume de líquido ascítico e as determinações no líquido ascítico e no soro dos peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP) e da atividade da amilase. No tecido pancreático foram realizadas as análises da peroxidação lipídica (MDA), da atividade da mieloperoxidase (MPO) e a análise histológica. Os níveis de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) foram analisados no líquido ascítico, soro e tecido pancreático. RESULTADOS: Os níveis de TAP e amilase no líquido ascítico e soro, de MDA e MPO no tecido pancreático e a análise histológica mostraram resultados iguais nos três grupos de animais que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH). Observamos redução do volume de líquido ascítico e dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10 no líquido ascítico, soro e tecido pancreático nos animais nos quais foi administrada solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$). CONCLUSÕES: A administração de solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) na pancreatite aguda experimental foi capaz de reduzir a resposta inflamatória local e sistêmica, sem modificar contudo a intensidade das lesões pancreáticas.

Descritores: 1. Pancreatite, 2. Solução salina hipertônica, 3. Inflamação, 4. citocinas, 5. SIRS

SUMMARY

COELHO, AMM. *Mechanisms of action of hypertonic saline solution in experimental acute pancreatitis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2010. 104p.

INTRODUCTION: Severe acute pancreatitis (AP) is characterized by hemodynamic alterations and systemic inflammatory response leading to a high mortality rate. In AP the inappropriate activation of pancreatic enzymes plays an important role in pancreas autodigestion and in the inflammatory mechanisms responsible for the systemic response of the disease. In a previous study, we have demonstrated that hypertonic saline solution infusion significantly reduced mortality in experimental AP through an improvement in the hemodynamic conditions and by an anti-inflammatory response, but its effects on the pancreatic lesions were not evaluated. The aim of the present study was to evaluate if the hypertonic saline solution reduces mortality in AP through a local effect attenuating the pancreatic lesion and/or by reducing the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **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 forty two male Wistar rats were divided into 4 groups: C (control, without AP), ST (no treated AP), SSF (animals received 34ml/kg of normal saline solution of NaCl 0.9% IV, 1 hour after AP), and SSH (animals received 4ml/Kg of hypertonic saline solution of NaCl 7.5% IV, 1 hour after AP). After 2, 12 and 24 hours of induction of AP volume of ascitic fluid, trypsinogen activation peptides (TAP) levels and amylase activity in ascitic fluid and serum were determined. Pancreatic lipid peroxidation (MDA), myeloperoxidase (MPO) activity, and pancreatic histology were analysed 2 and 24 hours after AP. TNF- α , IL-6, and IL-10 levels in ascitic fluid, serum, and pancreatic tissue were also analyzed. **RESULTS:** There were no significant differences in TAP levels and

amylase activity in the ascitic fluid and serum in animals of groups ST, SSF and SSH. No differences in pancreatic MPO, MDA and histological score were observed among these three groups with AP. In the SSH group it was observed a significant decrease in volume of ascitic fluid and inflammatory cytokines levels (TNF- α , IL-6, and IL-10) in ascitic fluid, serum, and pancreatic tissue when compared to ST and SSF groups ($p < 0.05$). CONCLUSIONS: These findings suggest that hypertonic saline solution decreases local and systemic inflammatory response in acute pancreatitis without changing the intensity of the pancreatic lesions.

Descriptors: 1. Pancreatitis, 2. Saline solution, hypertonic, 3. Inflammation, 4. cytokines, 5. SIRS

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) é um processo inflamatório do pâncreas de intensidade variável que, nas formas mais graves, se acompanha de envolvimento de outros órgãos e mesmo com os recentes avanços em diagnóstico, prevenção e tratamento continua sendo uma doença com altos níveis de morbidade e mortalidade (1-5).

As principais etiologias da PA são a biliar e a alcoólica e mais raramente a PA pode estar relacionada com hiperlipidemia, hipercalcemia, medicamentos, pancreatografia endoscópica, trauma e fatores hereditários. Em alguns casos o fator etiológico não pode ser determinado, sendo a doença considerada idiopática (6-8).

Independente do fator etiológico a ativação inapropriada intrapancreática das enzimas pancreáticas desempenha papel importante no desencadeamento dos mecanismos inflamatórios responsáveis pelas manifestações locais e sistêmicas da doença (9-13).

Do ponto de vista de quadro clínico, a PA se apresenta na maior parte dos casos de uma forma leve, caracterizada sob o aspecto anátomo-patológico, por edema do tecido pancreático, cujo tratamento limita-se a jejum e hidratação parenteral com mortalidade praticamente nula. No entanto, em 20% dos casos a PA se apresenta de forma grave

com necrose pancreática e/ou peripancreática cuja evolução e o quadro clínico estão relacionados com a intensidade e extensão da lesão pancreática e presença ou não de infecção (14-19).

A gravidade da doença é determinada por uma série de fatores que ocorrem após a instalação da lesão pancreática, como a ativação e liberação de enzimas pancreáticas, a ativação das células inflamatórias com recrutamento de macrófagos e neutrófilos e a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios, tais como, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas 1, 6 e 8, fator ativador plaquetário (PAF), a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e substâncias vasoativas (20-28). Estes mediadores são responsáveis, pela ocorrência de insuficiência respiratória, instabilidade hemodinâmica, alteração da permeabilidade vascular e insuficiência renal que determinam a gravidade da doença produzindo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), podendo resultar na ocorrência da insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (IMOS) (24,29-33) (Figura 1).

Na evolução da PA grave existe uma fase inicial logo após a instalação do processo agudo que é caracterizada por eventos relacionados a SIRS e suas graves consequências como insuficiência orgânica, sendo a mortalidade diretamente relacionada aos eventos inflamatórios. Posteriormente, surgem as complicações sépticas que são responsáveis pela piora no prognóstico (16-18,27).

Fatores etiológicos: Litíase biliar, Álcool, Hiperlipidemia, Hipercalcemia, Trauma, etc

Figura 1. Alterações que ocorrem após instalação da pancreatite grave. Adaptado de Norman J, 1998 (24).

A resposta inflamatória local caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, migração das células inflamatórias e liberação de citocinas, altera a microcirculação pancreática intensificando a lesão pancreática (21,23). Dessa forma, a gravidade da doença não é determinada apenas pelo grau da lesão pancreática, mas

também pela intensidade da resposta inflamatória local e sistêmica (16,34).

Diversos estudos clínicos e experimentais têm sido realizados com o objetivo de elucidar e minimizar os efeitos locais e sistêmicos envolvidos na PA. Assim, diversas substâncias têm sido utilizadas para bloquear a resposta inflamatória sistêmica e esclarecer o papel dos mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da PA (20,27). Algumas destas substâncias foram testadas no nosso meio e incluem os antagonistas do fator ativador plaquetário (PAF) (22,35), inibidores da bomba H^+K^+ (36), antioxidantes (37), análogos da somatostatina (38), inibidores da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) (39,40), estatinas (41), inibidores da síntese de $TNF-\alpha$ (42) e solução salina hipertônica a 7,5% (43).

O uso de soluções hipertônicas de NaCl 7,5% (SSH) foi pioneiramente descrito por Velasco et al. (44) no tratamento do choque hemorrágico em cães. Desde então, outros autores têm demonstrado os efeitos da SSH sobre diferentes funções celulares quando utilizada em ensaios clínicos ou experimentais para tratamento do trauma, choque hemorrágico e séptico e suporte volêmico intra-operatório de cirurgias de grande porte, mostrando melhora nos mecanismos hemodinâmicos além de uma ação anti-inflamatória (44-47).

As soluções salinas hipertônicas agem aumentando o fluxo sanguíneo microcirculatório através da mobilização de fluidos do compartimento intracelular para o espaço extracelular e vascular por

gradiente osmótico produzindo expansão volêmica intravascular. Atuam produzindo aumento da contratilidade do miocárdio, redução do edema endotelial e tecidual melhorando a microcirculação e promovem adicionalmente uma redução da viscosidade sanguínea devido à hemodiluição (44-46,48-50).

Vários estudos têm descrito seus efeitos imunomodulatórios benéficos, porém os mecanismos não estão ainda bem esclarecidos (47,51-59). Estudos em animais e experimentos em culturas de células isoladas têm mostrado os efeitos da hipertonicidade suprimindo várias funções dos neutrófilos. No choque hemorrágico observou-se redução da permeabilidade vascular através de alterações nas interações dos neutrófilos com o endotélio (60). Ciesla et al. (54) mostraram, em estudos realizados em neutrófilos polimorfonucleares isolados após estimulação com SSH, redução da liberação de enzimas proteolíticas, da produção de radicais livres e da expressão de moléculas de adesão pelos neutrófilos.

O aumento da tonicidade induz redução do volume celular e reorganização do citoesqueleto. Várias respostas citotóxicas dos neutrófilos como quimiotaxia, adesão, fagocitose e degranulação requerem a integridade do citoesqueleto. Ciesla et al. (56) sugerem que a hipertonicidade atua sobre a cascata de sinalização intracelular nos neutrófilos através da atenuação da atividade da proteína quinase ativada por mitógeno, MAPK p38, que pode ser ativada por uma série de estímulos, como as citocinas pró-inflamatórias (61).

Hipertonicidade também parece interferir com a produção e secreção das citocinas pelos macrófagos e monócitos, inibindo as pró-inflamatórias e ativando as anti-inflamatórias. Diversos estudos clínicos e experimentais foram utilizados para avaliar a interferência da SSH na expressão e secreção das citocinas. Estes estudos, no entanto, utilizaram diferentes níveis de tonicidade e diferentes ensaios para detecção das citocinas o que pode explicar a variabilidade dos resultados obtidos. A grande maioria deles, no entanto, apresentou evidências de que a SSH pode atenuar a produção das citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (55,62-64).

De outro lado, poucos ensaios clínicos têm sido realizados para estudar os efeitos imunomoduladores da SSH (65,66).

Rizoli et al. (65) e Bulger et al. (66) realizaram estudos clínicos demonstrando as propriedades anti-inflamatórias e imunológicas da SSH com dextran em pacientes com choque hemorrágico decorrente de trauma, e mostraram os efeitos imunomoduladores da SSH na fase precoce do tratamento do choque, promovendo uma resposta balanceada entre os mediadores pró e anti-inflamatórios, atenuando a resposta inflamatória.

Os ensaios clínicos relacionados ao choque hipovolêmico após trauma mostraram que o tratamento com SSH pode reduzir a mortalidade em pacientes hipotensos (67,68).

Estes efeitos benéficos da SSH no tratamento do choque hemorrágico não só com respeito à reposição volêmica como na redução

do processo inflamatório poderiam ser utilizados no tratamento da pancreatite aguda.

Com efeito, na pancreatite aguda a administração da solução salina hipertônica foi avaliada em vários estudos experimentais que demonstraram seus efeitos benéficos, porém nenhum deles avaliou de modo preciso a ação da solução salina hipertônica na lesão pancreática (69-75).

A administração de solução salina hipertônica promovendo melhora no fluxo sanguíneo pancreático pelos mecanismos acima descritos poderia minimizar as lesões pancreáticas e assim reduzir as manifestações sistêmicas secundárias à lesão pancreática.

A restituição da microcirculação pancreática precocemente pode atenuar a necrose acinar e mediadores vasoativos como óxido nítrico e endotelinas podem agir protegendo a perfusão microcirculatória (23).

Em trabalho recente demonstramos que a administração de solução salina hipertônica na PA experimental atenuou as alterações hemodinâmicas, reduziu as citocinas inflamatórias, as lesões sistêmicas, a infecção e necrose acinar pancreáticas. Como consequência destes efeitos houve redução significativa da mortalidade nos animais tratados com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) quando comparada a dos animais tratados com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e a dos animais que não foram tratados (43). Entretanto, neste trabalho não foi estudada a ação da solução salina hipertônica na ativação das enzimas

pancreáticas, que ocorre numa fase inicial da PA, e na própria lesão pancreática, o que poderia influenciar na gravidade da doença e, portanto, na intensidade das alterações sistêmicas.

Permaneceu a dúvida se a solução salina hipertônica melhorando o fluxo sanguíneo capilar poderia ter agido no pâncreas reduzindo a gravidade da lesão pancreática, o que se refletiria em uma menor ativação das enzimas pancreáticas e consequentemente em redução das lesões sistêmicas (76,77). Como demonstramos em trabalho anterior (28), após a redução do conteúdo enzimático do pâncreas através da administração de doses fisiológicas de ceruleína, observamos redução das enzimas pancreáticas, resultando em redução dos níveis de peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP), da produção de citocinas inflamatórias e da lesão mitocondrial hepática desenvolvida na PA. Estes dados demonstram que a intensidade da ativação das enzimas pancreáticas tem relação direta com as lesões sistêmicas e que a intensidade da resposta inflamatória sistêmica na pancreatite aguda está relacionada diretamente à magnitude da ativação enzimática intrapancreática.

A ação da solução salina hipertônica na resposta inflamatória sistêmica poderia estar relacionada a uma redução da ativação das enzimas pancreáticas, portanto a uma redução da própria lesão pancreática, e consequentemente, redução da resposta inflamatória sistêmica.

A compreensão dos mecanismos de ação da solução salina hipertônica na pancreatite aguda constitui condição importante para sua ulterior utilização na prática clínica.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar se o mecanismo de ação da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) reduzindo a gravidade da pancreatite aguda em ratos, ocorre devido à redução da intensidade da lesão pancreática e/ou à redução da resposta inflamatória sistêmica e seus efeitos.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – LIM/37 da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 - Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, HC-FMUSP N^o 635/04) e foram respeitadas 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 ratos machos Wistar com peso entre 230 e 250 g, 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 comercial (Nuvilab CR1-Nuvital Nutrientes LTDA) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Parke-Davis, São Paulo, Brasil)

3.3 - Delineamento experimental

Foram utilizados 142 ratos distribuídos nos seguintes grupos (Figura 2):

Grupo Controle (C): constituído por 16 animais que não foram submetidos a nenhuma manipulação cirúrgica.

Grupo ST: constituído por 42 animais que não receberam tratamento após a indução da PA.

Grupo SSF: constituído por 42 animais que receberam 34ml/Kg de solução salina fisiológica de NaCl 0,9% por via endovenosa em 5 minutos, 1 hora após a indução da PA.

Grupo SSH: constituído por 42 animais que receberam 4ml/Kg de solução salina hipertônica de NaCl 7,5% por via endovenosa em 5 minutos, 1 hora após a indução da PA.

A quantidade total de sódio administrada aos animais do grupo SSH (solução salina hipertônica 7,5%) foi a mesma administrada nos animais do grupo SSF (solução salina fisiológica 0,9%).

As escolhas da dose, da concentração e da velocidade da administração da solução hipertônica basearam-se em estudos anteriores que demonstram que nessas condições os níveis de sódio sérico elevam-se por períodos curtos de tempo e retornam rapidamente a níveis próximos do normal, sem desencadear os efeitos sistêmicos deletérios consequentes à hipernatremia (43,44).

Grupo C: animais não foram submetidos à indução da PA

Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental

3.4 - Indução da Pancreatite Aguda

A pancreatite aguda foi induzida, após anestesia dos animais com administração de cloridrato de cetamina 0,2 ml/100g de peso, 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 (78,79).

Após tricotomia abdominal foi realizada abertura da cavidade através de incisão mediana infra-xifoídia de aproximadamente 1,0 cm, exteriorização do arco duodenal e pâncreas, punção da porção contra-mesentérica do duodeno com agulha 25x7, cateterização do ducto biliar com cateter de polietileno (Intracath, PE50, Becton-Dickson, USA) e oclusão do ducto biliar ao nível do hilo hepático com pinça tipo *bulldog*, 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 microscopicamente pela presença de inflamação, necrose acinar e gordurosa, hemorragia e edema. Imediatamente após a infusão de taurocolato de sódio foram observados sinais macroscópicos de inflamação do tecido pancreático como edema e hiperemia (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Aspectos do duodeno e do pâncreas antes da indução da pancreatite. Observa-se o ducto biliar cateterizado e ocluído junto ao hilo hepático e o duodeno reparado com nylon 6-0.

Figura 4 Aspectos do duodeno e do pâncreas após a indução da pancreatite. Observa-se hiperemia e edema do tecido pancreático.

3.5 - Coleta dos materiais para análise

Duas, 12 e 24 horas após a PA os animais foram anestesiados, a parede abdominal foi reaberta e o líquido ascítico formado durante a PA foi colhido da cavidade abdominal por aspiração. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca. Os animais foram então sacrificados através de secção da veia cava superior.

O pâncreas foi cuidadosamente removido em duas porções, duodenal e esplênica, e para as dosagens realizadas no tecido pancreático de TBARS, MPO e mediadores inflamatórios foram utilizados fragmentos das duas porções a fim de se obter amostras homogêneas.

Foram realizados dois protocolos para coleta dos materiais a serem analisados:

A. Para as dosagens de TAP no líquido ascítico e no soro em 2 e 24 horas após a PA foram utilizados 6 animais de cada grupo.

B. Para a quantificação do volume de líquido ascítico, das dosagens de amilase, TBARS, MPO, mediadores inflamatórios e análise histológica os experimentos foram realizados novamente em 10 animais de cada grupo e as amostras foram colhidas conforme esquema abaixo:

- Líquido ascítico (2 horas após a PA): medida do volume de ascite e dosagens de amilase e mediadores inflamatórios
- Soro (2, 12 e 24 horas após a PA): dosagem de amilase e mediadores inflamatórios

- Tecido pancreático (2 e 24 horas após a PA): dosagem de TBARS, MPO, mediadores inflamatórios e análise histológica

3.6 - Determinação do volume de líquido ascítico

O líquido ascítico formado durante a PA foi colhido da cavidade abdominal por aspiração, utilizando uma seringa de 5 ml, após os animais serem anestesiados e a parede abdominal ser reaberta.

3.7 - Dosagem de peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP)

As amostras de sangue e líquido ascítico foram colhidas em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,20 mol/L pH 7,0 e foram aquecidas a 100°C por 10 minutos para completa inativação das proteases. Todas as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes estocados a - 20°C.

A ativação do tripsinogênio produz peptídeos de baixo peso molecular (TAP), que são peptídeos liberados na ativação dos tripsinogênios aniônico (TAP-TA) e catiônico (TAP-TC), e a relação TAP-TA/TAP-TC foi utilizada como parâmetro para avaliação da gravidade da PA (80-83). As dosagens do TAP foram realizadas por radioimunoensaio no Laboratório do Dr Björn Lindkvist do Departamento de Cirurgia na Universidade de Malmö, Suécia, utilizando método previamente descrito (83).

3.8 - Dosagem de amilase

A determinação da atividade da amilase foi realizada no soro e no líquido ascítico pelo método colorimétrico de Jamieson (84) e os resultados foram expressos em U/ml, sendo que 1 unidade de atividade de amilase corresponde a 1 μ mol de maltose liberada/min.

3.9 - Avaliação da peroxidação lipídica

A quantificação da peroxidação lipídica no tecido pancreático foi realizada através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA) por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram homogeneizadas em KCl, centrifugadas e no sobrenadante foi adicionada uma solução contendo ácido tiobarbitúrico, duodecilsulfato de sódio, ácido acético glacial e água destilada. A mistura foi aquecida a 90°C por 45 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas (15.000rpm, 10 minutos). As concentrações dos produtos da peroxidação lipídica foram expressas pela concentração de TBARS. Os resultados foram expressos em nmolMDA/mg proteína (85).

3.10 - Análise histológica do tecido pancreático

Fragmentos da porção duodenal do pâncreas dos animais foram fixados em solução de formol 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 cinco micrômetros e corados através da técnica de hematoxilina-eosina (HE) e observados à microscopia óptica.

A avaliação do tecido pancreático foi realizada através da utilização da classificação proposta por Schmidt et al. (86), analisando as seguintes variáveis: edema, necrose acinar, inflamação e infiltrado perivascular, necrose gordurosa e hemorragia (Tabela 1). A figura 5 ilustra os principais aspectos observados na pancreatite aguda induzida pelo método utilizado no presente estudo.

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

Tabela 1. Classificação do processo inflamatório do tecido pancreático proposta por Schmidt et al. (86)

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

Figura 5. Aspecto microscópico de fragmento de pâncreas de rato com PA 2 horas após a PA. Coloração: HE. Aumento 40x. Presença de acentuado edema lobular (1), necrose (2), hemorragia (3) e infiltrado inflamatório (4)

3.11 - Dosagem de mieloperoxidase pancreática (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase pancreática (MPO) foi utilizada como índice de infiltração neutrofílica no pâncreas. As amostras foram homogeneizadas com homogeneizador Polytron, usando tampão PBS contendo 0,5% de hexadecil e 5mM EDTA, pH 6,0. As amostras homogeneizadas foram submetidas ao ultrassom (40Hz) e, posteriormente, centrifugadas a 5000rpm por minuto. A atividade da MPO no sobrenadante foi quantificada através da densidade óptica (DO) a 490nm resultante da decomposição de H_2O_2 na presença de O-dianisina (87,88). Os resultados foram expressos em DO a 490nm.

3.12 - Dosagem dos mediadores inflamatórios

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas em amostras de líquido ascítico, soro e tecido pancreático. As amostras de líquido ascítico e sangue foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes estocados a -80°C. Amostras de tecido pancreático foram homogeneizadas em solução tampão PBS, centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes armazenados a -80°C.

A determinação quantitativa dos mediadores inflamatórios foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) através da utilização dos kits da *Biosource International Cytoscreen™* para dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10. Os resultados foram expressos em pg/ml no líquido ascítico e soro. No tecido pancreático essas dosagens foram relacionadas com a concentração de proteínas determinadas pelo método de Lowry et al. (89) e expressas em pg/mg proteína.

3.13 - Análise estatística

A análise descritiva do estudo foi efetuada sob a forma de gráficos. Os resultados do volume de líquido ascítico e das dosagens de amilase, TAP, TNF- α , IL-6, IL-10, TBARS e MPO estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo teste de análise de variância. Quando houve diferença estatística foi aplicado o teste de Tukey. A comparação no mesmo grupo em tempos diferentes de PA foi analisada pelo teste *t* de Student (90,91).

Os resultados da análise histológica dos pâncreas, ou seja, do edema, da necrose acinar, necrose gordurosa, hemorragia, inflamação e infiltrado perivascular são apresentados como mediana e foram analisados utilizando teste de Kruskal-Wallis (90,91).

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o Programa Estatístico *GraphPad Prism* versão 4.0 e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados foram agrupados de acordo com as avaliações estudadas:

4.1 - Avaliação da lesão pancreática

4.1.1 - Dosagem dos peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP)

4.1.2.1 - Líquido ascítico

Duas horas após a indução da PA não foram observadas diferenças significantes nos resultados da relação TAP-tripsinogênio aniônico/TAP-tripsinogênio catiônico (TAP-TA/TAP-TC) no líquido ascítico entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH) (Figura 6). Não foi observado líquido ascítico no período de 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 6. Valores das médias $\pm$ epm da relação TAP-TA/TAP-TC no líquido ascítico. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.1.1.2 - Soro

Não foi detectada a presença de TAP no soro dos animais do grupo controle. Duas e 24 horas após a indução da PA não foram observadas diferenças significantes na relação de TAP-tripsinogênio aniônico/TAP-tripsinogênio catiônico (TAP-TA/TAP-TC) no soro entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH). Comparando os resultados da relação TAP-TA/TAP-TC no soro em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, foi observado que

estes se mostraram maiores em 24 horas nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST,SSF e SSH) ($p<0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Valores das médias $\pm$ epm da relação TAP-TA/TAP-TC no soro. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.1.2 - Dosagem de amilase

4.1.2.1 - Líquido ascítico

Os resultados da atividade da amilase no líquido ascítico não se mostraram estatisticamente diferentes 2 horas após a indução da PA nos animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH) (Figura 8). Não foi observado líquido ascítico 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 8. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de amilase no líquido ascítico. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.1.2.2 - Soro

Os resultados da atividade da amilase sérica 2 horas após a indução da PA apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH), e os níveis se mantiveram aumentados até o período de 24 horas após a indução da PA quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$). Após 2 e 24 horas da indução da PA não foram observadas diferenças significantes nos resultados da atividade da amilase sérica entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH). Comparando os resultados da amilase sérica em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, foi observado que estes se mostraram maiores em 24 horas nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) ($p<0,05$) (Figura 9).

Figura 9. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de amilase sérica. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.1.3 - Determinação da peroxidação lipídica no tecido pancreático

Os resultados dos níveis de TBARS no tecido pancreático 2 e 24 horas após a indução da PA apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$). Após 2 e 24 horas da indução da PA não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TBARS no tecido pancreático entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH). Comparando os resultados de TBARS no tecido pancreático em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, foi observada redução em 24 horas nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) ($p<0,05$) (Figura 10).

Figura 10. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de TBARS no tecido pancreático. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.1.4 - Análise histológica do tecido pancreático

Os animais dos grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) apresentaram lesões pancreáticas características de pancreatite aguda grave: edema, necrose acinar, inflamação e infiltrado perivascular, necrose gordurosa e hemorragia. Os animais do grupo controle apresentaram tecido pancreático normal.

Após 2 e 24 horas da indução da PA não foram observadas diferenças significantes em nenhum dos parâmetros histológicos estudados entre os grupos de animais que foram submetidos a PA sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH).

Comparando os resultados dos escores histológicos em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a PA, também não foram observadas diferenças significantes entre os animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) (Figura 11).

Figura 11. Representação dos valores dos escores histológicos no tecido pancreático. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica), mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo.

4.2 - Avaliação da resposta inflamatória sistêmica

4.2.1 - Determinação do volume de líquido ascítico

Duas horas após a indução da PA foi observada redução significativa do volume de líquido ascítico nos animais que receberam tratamento com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais que receberam tratamento com solução salina fisiológica (grupo SSF) e os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$) (Figura 12). Não foi observado líquido ascítico 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 12. Valores das médias $\pm$ epm do volume de líquido ascítico. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.2.2 - Dosagem dos mediadores inflamatórios

4.2.2.1 - Líquido ascítico

TNF- α

Duas horas após a indução da PA foi observada redução significativa nos níveis de TNF- α no líquido ascítico nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$) (Figura 13). Não foi observado líquido ascítico 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 13. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de TNF- α no líquido ascítico. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

IL-6

Após 2 horas da indução da PA não foram observadas diferenças significantes nos níveis de IL-6 no líquido ascítico entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH) (Figura 14). Não foi observado líquido ascítico 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 14. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-6 no líquido ascítico. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

IL-10

Duas horas após a indução da PA foi observada redução significativa nos níveis de IL-10 no líquido ascítico nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p<0,05$) (Figura 15). Não foi observado líquido ascítico 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 15. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-10 no líquido ascítico. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.2.2.2 - Soro

TNF- α

Duas horas após a indução da PA foi observada redução significativa nos níveis de TNF- α no soro dos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) e nos animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) quando comparados com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$) (Figura 16). Não foi detectada a presença de TNF- α no soro dos animais 12 e 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Figura 16. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de TNF- α no soro. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

IL-6

Duas horas após a indução da PA foi observada redução significativa nos níveis de IL-6 no soro dos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) e nos animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) quando comparados com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$) (Figura 17).

Após 12 horas da indução da PA foi observada redução significativa nos níveis de IL-6 no soro nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$) (Figura 17).

Não foi detectada a presença de IL-6 no soro dos animais 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Comparando os resultados da determinação de IL-6 no soro em 2 horas com os resultados obtidos 12 horas após a indução da PA, foi observado que os animais tratados com solução salina fisiológica apresentaram níveis de IL-6 maiores 12 horas após a indução da PA ($p < 0,05$), enquanto nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) não foram observadas diferenças significantes entre 2 e 12 horas após a indução da PA (Figura 17).

Figura 17. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-6 no soro. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

IL-10

Duas e 12 horas após a indução da PA foi observada redução significativa nos níveis de IL-10 no soro nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$) (Figura 18).

Não foi detectada a presença de IL-10 no soro dos animais 24 horas após a indução da PA e nos animais do grupo controle (C).

Comparando os resultados de IL-10 no soro em 2 horas com os resultados obtidos 12 horas após a indução da PA, foi observado que estes se mostraram menores em 12 horas nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 18. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-10 no soro. Grupos de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.3 - Avaliação da resposta inflamatória local

4.3.1 - Dosagem dos mediadores inflamatórios no tecido pancreático

TNF- α

Duas e 24 horas após a indução da PA foi observado redução significativa nos níveis de TNF- α no tecido pancreático nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH), quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$). Os níveis de TNF- α no tecido pancreático dos animais tratados com SSH não diferiram dos níveis encontrados nos animais do grupo controle C (Figura 19).

Comparando os resultados de TNF- α no tecido pancreático em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, foi observado que estes não apresentaram diferenças significantes nos 2 períodos analisados nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) (Figura 19).

F

Figura 19. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de TNF- α no tecido pancreático. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

IL-6

Duas e 24 horas após a indução da PA foi observado redução significativa nos níveis de IL-6 no tecido pancreático nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) ($p < 0,05$). Os níveis de IL-6 no tecido pancreático dos animais tratados com SSH não diferiram dos níveis encontrados nos animais do grupo controle C (Figura 20).

Comparando os resultados de IL-6 no tecido pancreático em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, foi observado que estes se mostraram menores em 24 horas nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) ($p < 0,05$) (Figura 20).

Figura 20. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-6 no tecido pancreático. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

IL-10

Os resultados dos níveis de IL-10 no tecido pancreático 2 horas após a indução da PA apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH), e os níveis se mantiveram aumentados até o período de 24 horas após a indução da PA quando comparados com os animais do grupo controle ($p < 0,05$). Após 2 e 24 horas da indução da PA não foram observadas diferenças significantes nos níveis de IL-10 no tecido pancreático entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH). Comparando os resultados de IL-10 no tecido pancreático em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, observamos que estes não apresentaram diferenças significativas nos 2 períodos analisados nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) (Figura 21).

Figura 21. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de IL-10 no tecido pancreático. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.3.2 – Relação IL-10/TNF- α no tecido pancreático

Duas e 24 horas após a indução da PA foi observado aumento significativo da relação IL-10/TNF- α no tecido pancreático nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF), sem tratamento (grupo ST) e do grupo controle (C) ($p < 0.05$) (Figuras 22 e 23).

Figura 22. Valores das médias $\pm$ epm das razões de IL-10/TNF α no tecido pancreático 2 horas após PA. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

Figura 23. Valores das médias $\pm$ epm das razões de IL-10/TNF α no tecido pancreático 24 horas após PA. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.3.3 – Relação IL-10/IL-6 no tecido pancreático

Duas e 24 horas após a indução da PA foi observado aumento significativo da relação IL-10/IL-6 no tecido pancreático nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF), sem tratamento (grupo ST) e do grupo controle (C) ($p < 0.05$) (Figuras 24 e 25).

Figura 24. Valores das médias $\pm$ epm das razões de IL-10/IL-6 no tecido pancreático 2 horas após PA. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

Figura 25. Valores das médias $\pm$ epm das razões de IL-10/IL-6 no tecido pancreático 24 horas após PA. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

4.3.4 - Determinação de mieloperoxidase no tecido pancreático (MPO)

Os resultados da atividade da MPO no tecido pancreático 2 horas após a indução da PA apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH), e os níveis se mantiveram aumentados até o período de 24 horas após a indução da PA, quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$). Após 2 e 24 horas da indução da PA não foram observadas diferenças significantes nos resultados da atividade da MPO no tecido pancreático entre os animais dos grupos sem tratamento (grupo ST), tratados com NaCl 0,9% (grupo SSF) e tratados com NaCl 7,5% (grupo SSH). Comparando os resultados da atividade da MPO no tecido pancreático em 2 horas com os resultados obtidos 24 horas após a indução da PA, foi observado que estes se mostraram maiores em 24 horas nos animais dos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) ($p<0,05$) (Figura 26).

Figura 26. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de MPO no tecido pancreático. Grupos Controle (C) e de ratos submetidos a PA: ST (sem tratamento), SSF (tratamento com solução salina fisiológica) e SSH (tratamento com solução salina hipertônica).

5. *DISCUSSÃO*

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar se, a ação da solução salina hipertônica reduzindo a gravidade da pancreatite aguda em ratos, como demonstramos em trabalho recente onde foi observada atenuação das alterações hemodinâmicas e redução das citocinas inflamatórias e das lesões sistêmicas (43), ocorre devido à redução da intensidade da lesão pancreática e/ou à redução da resposta inflamatória sistêmica e seus efeitos.

Diversos métodos podem ser utilizados para o estudo da intensidade da lesão pancreática. A determinação dos níveis de peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP) mantém relação com a gravidade da lesão pancreática, sendo excelente método para avaliar a lesão pancreática (81-82). A ativação do tripsinogênio produz peptídeos de baixo peso molecular (TAP), que são peptídeos liberados na ativação dos tripsinogênios aniônico (TAP-TA) e catiônico (TAP-TC), e a relação TAP-TA/TAP-TC pode ser utilizada como parâmetro para avaliação da gravidade da PA (80,83).

No presente estudo, analisamos no líquido ascítico e no soro os níveis de TAP liberados pelos tripsinogênios aniônico e catiônico na PA após administração de solução salina hipertônica, solução salina fisiológica e em ratos sem tratamento, 2 e 24 horas após indução da PA, e

observamos que não houve diferença nos níveis de TAP nos três grupos que foram submetidos a PA (Figuras 6 e 7).

Os resultados da atividade da amilase no líquido ascítico e no soro também não foram diferentes nos três grupos submetidos a PA (Figuras 8 e 9).

A importância das enzimas pancreáticas na patogênese da doença foi salientada no nosso meio por Gonzalez et al. (92-94) e posteriormente por Coelho et al. (76) e Machado et al. (77), que utilizando doses fisiológicas de ceruleína, observaram que a redução do conteúdo enzimático pancreático acarretou a diminuição da mortalidade em animais submetidos a PA. Do mesmo modo, utilizando modelo experimental semelhante, outros estudos foram realizados para avaliações das lesões sistêmicas desenvolvidas na PA, observando-se melhora das lesões hepáticas (95) e pulmonares (96,97) e redução dos mediadores inflamatórios (28).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a ativação enzimática não foi modificada pela ação da solução hipertônica ou pela expansão volêmica com a solução salina isotônica, portanto, a ação da solução salina hipertônica na redução da gravidade da PA, não pode ser explicada por esse mecanismo.

As alterações histológicas do tecido pancreático nesta fase inicial da PA também se mostraram semelhantes nos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) (Figura 11).

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado o papel central do estresse oxidativo na patogênese da PA, estando a intensidade do processo relacionado com a gravidade da doença (25,26). A avaliação do estresse oxidativo pode ser realizada pela quantificação da peroxidação lipídica no tecido pancreático através da determinação da concentração de MDA, por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (25,26,85). No presente trabalho, os resultados da determinação de MDA no tecido pancreático foram semelhantes nos três grupos submetidos a PA (Figura 10), o que sugere que não exista diferença significativa na gravidade das lesões pancreáticas entre os grupos com PA estudados.

A solução salina hipertônica, portanto, apesar de possivelmente modificar o fluxo microcirculatório como demonstrado em vários trabalhos (44-46,48-50), não interferiu na gravidade da lesão pancreática em si, não modificando a intensidade da ativação enzimática e as alterações histológicas em si.

Houve, no entanto, redução do volume de líquido ascítico no grupo com solução salina hipertônica quando comparado ao grupo sem tratamento ou com administração de solução salina fisiológica (Figura 12).

Trabalhos anteriores demonstraram que a administração de tripsina na cavidade peritoneal estimula a produção de citocinas pelos macrófagos peritoneais *in vitro* e *in vivo* (98). Como a intensidade de ativação do tripsinogênio demonstrada pela liberação do TAP foi semelhante nos três grupos com PA estudados, pode-se supor que as

reduções do volume de líquido ascítico (Figura 12) e dos níveis de TNF- α no líquido ascítico (Figura 13) sejam decorrentes da ação da solução salina hipertônica reduzindo a produção de citocinas pelos macrófagos peritoneais.

Neste contexto, nos animais do grupo com SSH observamos também redução dos níveis de IL-6 e IL-10 no líquido ascítico, embora em relação a IL-6 não serem estatisticamente significante (Figuras 14 e 15).

Os macrófagos regulam muitos aspectos da patogênese da síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Embora geralmente exerçam função protetora, em alguns casos podem causar lesão tecidual. Os macrófagos peritoneais ativados são as principais fontes de produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , que estão presentes na cavidade peritoneal e nos tecidos peripancreáticos na PA (99-101).

A possível ação da solução salina hipertônica nos macrófagos peritoneais, portanto, pode ter contribuído para a redução da resposta inflamatória sistêmica na PA. A importância dos macrófagos peritoneais na patogênese da resposta inflamatória na PA foi comprovada em trabalho anterior que demonstrou que a insuflação abdominal com CO₂ reduz a resposta inflamatória sistêmica provavelmente por bloqueio da produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos peritoneais (102).

A intensidade da resposta inflamatória e a gravidade da PA podem ser avaliadas pelos altos níveis de citocinas circulantes que

constituem os principais fatores determinantes do desenvolvimento de IMOS (30,31).

No presente estudo, 2 horas após a indução da PA, observou-se redução significativa dos níveis séricos de TNF- α e IL-6 nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) e com solução salina fisiológica (grupo SSF), mostrando que nesta fase inicial da PA a ação benéfica da reposição volêmica é independente da solução utilizada. No entanto, 12 horas após a indução da PA os níveis de IL-6 no soro dos animais tratados com SSF aumentaram atingindo os níveis observados nos animais sem tratamento (grupo ST), sugerindo que a solução salina fisiológica apresenta ação benéfica, porém por um curto período de tempo (Figuras 16 e 17).

Os níveis séricos de IL-10 nesta fase da PA mantêm relação com os níveis séricos de TNF- α e de IL-6 (30). Duas e 12 horas após a indução da PA observamos redução significativa dos níveis séricos de IL-10 nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST) (Figura 18).

Esses resultados acima descritos sugerem redução da resposta inflamatória sistêmica nos animais tratados com solução salina hipertônica.

Por outro lado, as citocinas são também produzidas no tecido pancreático pelas células acinares na PA e se correlacionam com a

intensidade do processo inflamatório e com a gravidade da doença (103-105).

Neste estudo observamos níveis elevados de TNF- α , IL-6 e IL-10 no tecido pancreático após a indução da PA. Os animais nos quais foi administrada solução salina hipertônica apresentaram redução dos níveis de TNF- α e de IL-6 no tecido pancreático 2 e 24 horas após a indução da PA quando comparados com os animais do grupo sem tratamento e com os animais tratados com solução salina isotônica (Figuras 19, 20 e 21).

A redução dos níveis de TNF- α e IL-6 no tecido pancreático no entanto, não se acompanhou de redução dos níveis de IL-10 no tecido pancreático (Figuras 19, 20 e 21). De outro lado, observamos um aumento nas relações IL-10/TNF- α e IL-10/ IL-6 no tecido pancreático 2 e 24 horas após a PA, nos animais tratados com solução salina hipertônica (grupo SSH) quando comparados com os animais tratados com solução salina fisiológica (grupo SSF) e com os animais sem tratamento (grupo ST). Esse aumento das relações IL-10/TNF- α e IL-10/ IL-6 no tecido pancreático sugere uma atividade anti-inflamatória da SSH (Figuras 22-25).

A redução dos níveis de TNF- α e IL-6 no tecido pancreático foi independente da redução do recrutamento de leucócitos no tecido pancreático, avaliado pela determinação da atividade da MPO no pâncreas, que não foi diferente nos três grupos que foram submetidos a PA (ST, SSF e SSH) (Figura 26). A SSH influenciou a produção de

citocinas pelos leucócitos, mas não o seu recrutamento na PA, que provavelmente está relacionado com a produção de citocinas *in situ* pelas células acinares do pâncreas (103-105).

Trabalhos anteriores demonstraram, após a administração da SSH na PA, redução do recrutamento de neutrófilos nos pulmões avaliado pela determinação da atividade da MPO (43,73,75). Este achado possivelmente se deve ao fato de que a lesão pulmonar é secundária à produção de citocinas por leucócitos e células mononucleares na PA, que é bloqueada pela SSH (Figuras 16,17 e 18).

Hatanaka et al. (106) mostraram os efeitos da SSH reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares e neutrófilos humanos estimulados com LPS. O mecanismo pelo qual a solução salina hipertônica reduz a produção de citocinas não está bem esclarecido, no entanto, alguns trabalhos demonstraram que a hipertoncidade, alterando a conformação celular e a reorganização do citoesqueleto, reduz a atividade da MAPK p38, uma das vias de sinalização intracelular, interferindo diretamente na produção de citocinas inflamatórias (56,107).

Os dados do presente estudo demonstram que na pancreatite aguda a solução salina hipertônica reduziu não só a resposta inflamatória sistêmica como a resposta inflamatória local, contudo sem modificar a intensidade das lesões pancreáticas.

Os resultados obtidos através deste estudo facilitam a compreensão dos mecanismos de ação da solução salina hipertônica na

pancreatite aguda, evidenciados por sua ação anti-inflamatória local e sistêmica, o que pode contribuir para a utilização racional da solução salina hipertônica em futuros ensaios clínicos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

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

A administração de solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) na pancreatite aguda experimental não interferiu na ativação das enzimas pancreáticas e não reduziu a intensidade das lesões pancreáticas.

A solução salina hipertônica reduziu os níveis de citocinas no soro, no líquido ascítico e no tecido pancreático, reduzindo a resposta inflamatória sistêmica na pancreatite aguda experimental.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

ANEXO 1. Valores da relação TAP-TA/TAP-TC no líquido ascítico 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	0,69	0,77	0,52
2	0,83	0,73	0,77
3	0,90	0,55	0,24
4	0,74	0,29	0,44
5	0,34	0,15	0,39
6	0,41	0,26	0,35
Média	0,65	0,46	0,45
DP	0,23	0,26	0,18
EPM	0,09	0,11	0,07

ANEXO 2. Valores da relação TAP-TA/TAP-TC no soro 2 horas após a indução da PA.

Ratos	C	ST	SSF	SSH
1	0	0,38	0,28	0,00
2	0	0,00	0,00	0,32
3	0	0,96	0,00	0,00
4	0	0,40	0,25	0,00
5	0	0,00	0,00	0,00
6	0	0,00	0,00	0,20
Média	0	0,29	0,09	0,09
DP		0,38	0,14	0,14
EPM		0,16	0,06	0,06

ANEXO 3. Valores da relação TAP-TA/TAP-TC no soro 24 horas após a indução da PA

Ratos	ST	SSF	SSH
1	1,00	0,23	0,50
2	0,50	0,50	0,50
3	1,64	1,70	0,60
4	0,20	0,50	0,40
5	0,65	0,50	1,00
6	0,68	0,80	0,80
Média	0,78	0,71	0,63
DP	0,50	0,52	0,23
EPM	0,20	0,21	0,09

ANEXO 4. Valores de amilase no líquido ascítico (U/ml) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	274	182	-
2	154	168	104
3	131	161	150
4	294	98	123
5	241	239	195
6	243	205	143
7	157	92	193
8	120	137	275
9	219	172	226
10	145	143	-
Média	198	160	176
DP	64	45	57
EPM	20	14	20

ANEXO 5. Valores de amilase sérica (U/ml) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	C	ST	SSF	SSH
1	7,2	9,2	9,4	8,9
2	7,5	10,0	9,1	10,8
3	7,4	10,6	9,1	8,5
4	7,5	9,3	8,8	11,0
5	8,2	9,7	9,1	10,4
6	8,0	10,0	10,2	10,2
7	8,3	9,3	9,3	9,5
8	8,5	9,5	10,0	9,7
9	7,4	10,1	9,0	10,1
10	7,3	9,8	9,1	9,7
Média	7,7	9,8	9,3	9,9
DP	0,5	0,4	0,4	0,8
EPM	0,2	0,1	0,1	0,3

ANEXO 6. Valores de amilase sérica (Uml) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	12,8	12,8	12,8
2	12,3	9,2	11,1
3	10,8	12,8	10,0
4	12,5	11,2	13,8
5	11,9	14,0	12,5
6	11,2	12,0	11,6
7	12,8	12,1	14,1
8	12,7	11,9	12,0
9	13,1	12,5	12,7
10	11,9	12,0	11,9
Média	12,2	12,1	12,3
DP	0,7	1,2	1,2
EPM	0,2	0,4	0,4

ANEXO 7. Valores de TBARS no tecido pancreático (nmoles/mg proteína)
2 horas após a indução da PA.

Ratos	C	ST	SSF	SSH
1	1,17	3,94	5,58	2,90
2	0,80	3,33	6,29	2,42
3	0,04	2,82	2,22	2,77
4	0,70	2,71	2,60	1,72
5	1,75	3,00	3,33	2,61
6	1,00	2,97	1,32	2,44
7	0,63	0,68	3,03	1,23
8	0,08	1,53	0,07	2,09
9	0,52	2,08	1,57	1,05
10	0,10	0,07	1,10	2,36
Média	0,68	2,31	2,71	2,16
DP	0,54	1,22	1,96	0,63
EPM	0,17	0,39	0,62	0,20

ANEXO 8. Valores de TBARS no tecido pancreático (nmoles/mg proteína)
24 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	0,87	0,13	2,04
2	2,08	3,00	0,08
3	0,21	2,10	0,95
4	1,56	0,06	1,76
5	2,75	3,13	0,25
6	2,88	0,11	0,65
7	0,92	0,06	2,45
8	2,98	1,21	3,43
9	1,71	0,91	1,34
10	0,50	0,62	0,33
Média	1,65	1,13	1,33
DP	1,01	1,21	1,09
EPM	0,32	0,38	0,34

ANEXO 9. Análise histológica do tecido pancreático do grupo controle (C).

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	0,5	0,5	0,5	0	0	1,5
2	0,5	0	0,5	0	0	1,0
3	0,5	0	0,5	0	0	1,0
4	1,0	0	0	0	0	1,0
5	1,0	0	0	0	0	1,0
6	0,5	0	0	0	0	0,5
7	0,5	0,5	0	0	0	1,0
8	0,5	0,5	0	0	0	1,0
9	1,0	0	0,5	0	0	1,5
10	0,5	0	0	0	0	0,5
Mediana	0,5	0	0	0	0	1,0

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 10. Análise histológica do tecido pancreático do grupo Sem Tratamento (ST) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	1,5	2,5	1,0	0	0	5,0
2	1,5	1,0	1,0	0	0	3,5
3	1,5	2,0	1,0	0	0	4,5
4	0,5	0,5	0,5	0	0	1,5
5	2,0	1,5	1,0	0	0	4,5
6	2,0	2,0	1,0	0	0	5,0
7	2,0	4,0	1,5	0	0	7,5
8	2,0	4,0	1,5	0	0	7,5
9	1,5	3,5	1,5	0	0	6,5
10	2,0	0,5	0,5	0	0	3,0
Mediana	1,8	2	1	0	0	4,8

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 11. Análise histológica do tecido pancreático do grupo solução Salina Fisiológica (SSF) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	1,5	2,5	1,0	0	0	5,0
2	1,5	2,0	1,0	0	0	4,5
3	1,5	3,0	1,5	0	0	6,0
4	2,0	2,0	1,0	0	0	5,0
5	2,0	1,0	1,0	0	0	4,0
6	1,5	1,0	0,5	0	0	3,0
7	2,0	3,0	1,0	0	0	6,0
8	2,0	3,0	1,0	0	0	6,0
9	1,0	1,0	0,5	0	0	2,5
10	2,0	1,0	0,5	0	0	3,5
Mediana	1,8	2,0	1,0	0,0	0,0	4,8

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 12. Análise histológica do tecido pancreático do grupo solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	1,0	2,5	1,0	0	0	4,5
2	2,0	2,0	1,0	0	0	5,0
3	1,5	2,0	1,0	0	0	4,5
4	1,5	2,0	1,0	0	0	4,5
5	0,5	0,5	0,5	0	0	1,5
6	0,5	0,5	0,5	0	0	1,5
7	1,0	1,0	0,5	0	0	2,5
8	2,0	2,0	0,5	0	0	4,5
9	2,0	1,5	1,0	0	0	4,5
10	2,0	0,5	0,5	0	0	3,0
Mediana	1,5	1,8	0,8	0,0	0,0	4,5

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 13. Análise histológica do tecido pancreático do grupo Sem Tratamento (ST) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	2,5	3,5	2,0	0	1,0	9,0
2	2,5	2,5	2,5	0	0	7,5
3	2,5	0,5	1,0	0	0	4,0
4	2,5	0,5	2,5	0	0,5	6,0
5	2,0	1,0	2,0	0,5	0,5	6,0
6	2,0	0	1,0	0,5	0	3,5
7	2,0	0,5	2,0	0,5	0	5,0
8	2,0	0,5	1,0	0,5	0	4,0
9	2,5	1,5	2,0	0	0,5	6,5
10	2,0	2,0	1,5	0	0	5,5
Mediana	2,3	0,8	2	0	0	5,8

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 14. Análise histológica do tecido pancreático do grupo Solução Salina Fisiológica (SSF) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	2,0	2,0	1,0	0	0	5,0
2	2,5	1,0	1,0	0	0	4,5
3	2,5	1,0	2,0	0,5	0	6,0
4	2,5	1,0	2,0	0,5	0,5	6,5
5	2,5	1,0	2,0	1,0	1,0	7,5
6	2,5	1,0	2,0	0,5	0,5	6,5
7	2,5	2,0	1,0	0	0	5,5
8	2,5	1,0	1,0	0	0	4,5
9	2,5	1,0	1,0	0	0	4,5
10	2,0	2,0	1,0	0	0	5,0
Mediana	2,5	1,0	1,0	0,0	0,0	5,3

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 15. Análise histológica do tecido pancreático do grupo Solução Salina Hipertônica (SSH) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	E	NA	IIP	NG	H	Soma
1	2,5	1,0	1,0	0	0	4,5
2	2,5	1,5	1,0	0,5	0,5	6,0
3	2,5	1,5	1,5	0,5	0	5,0
4	2,0	1,5	1,5	0,5	0,5	6,0
5	2,0	1,5	1,5	0	0	5,0
6	2,5	1,5	1,5	0,5	1,0	7,0
7	2,5	0,5	1,0	0,5	0	4,5
8	2,0	0,5	1,0	0	0	3,5
9	2,5	1,5	1,5	0	0	5,5
10	2,0	1,0	1,0	0	0,5	4,5
Mediana	2,5	1,5	1,3	0,0	0,0	5,0

E: edema; NA: necrose acinar; IIP: Inflamação e Infiltrado perivascular;
NG: necrose gordurosa e H: hemorragia

ANEXO 16. Valores do volume de líquido ascítico (ml) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	C	ST	SSF	SSH
1	0	1,2	2,0	0
2	0	1,0	2,2	1,8
3	0	4,2	2,4	1,4
4	0	1,0	2,0	0,8
5	0	1,0	1,0	0,4
6	0	1,0	2,2	1,0
7	0	3,0	1,0	0,8
8	0	2,4	1,0	1,4
9	0	2,0	1,6	1,0
10	0	1,5	2,0	0
Média	0	1,8	1,7	0,9
DP		1,1	0,6	0,6
EPM		0,3	0,2	0,2

ANEXO 17. Valores de TNF- α , no líquido ascítico (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	141	209	-
2	145	165	17
3	150	393	89
4	124	558	94
5	207	91	80
6	185	221	49
7	146	80	81
8	341	75	57
9	184	132	44
10	300	50	-
Média	192	197	64
DP	73	162	27
EPM	23	51	10

ANEXO 18. Valores de IL-6, no líquido ascítico (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	1312	1742	-
2	2294	1706	1339
3	2011	1538	1384
4	1349	1544	1794
5	1379	1997	1960
6	2311	2689	1593
7	2307	2095	1239
8	2122	1919	1643
9	2675	1480	1522
10	2402	1952	-
Média	2016	1866	1559
DP	493	359	241
EPM	156	114	85

ANEXO 19. Valores de IL-10, no líquido ascítico (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	560	516	-
2	704	484	386
3	642	604	784
4	694	678	242
5	444	664	304
6	554	652	310
7	674	568	356
8	990	842	580
9	630	510	460
10	580	602	-
Média	647	612	428
DP	144	105	178
EPM	46	33	63

ANEXO 20. Valores de TNF- α no soro (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	50	137	0
2	69	0	0
3	49	113	0
4	121	37	0
5	67	11	0
6	80	84	12
7	250	10	93
8	320	20	68
9	104	0	0
10	150	0	23
Média	126	41	20
DP	91	51	34
EPM	29	16	11

ANEXO 21. Valores de IL-6 no soro (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	93	0	33
2	89	31	0
3	42	0	0
4	0	26	0
5	35	22	15
6	104	0	41
7	44	37	31
8	117	0	0
9	102	30	0
10	267	0	30
Média	89	15	15
DP	73	16	17
EPM	23	5	5

ANEXO 22. Valores de IL-6 no soro (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 12 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	0	24	0
2	67	150	0
3	104	28	0
4	25	10	20
5	24	181	7
6	121	20	30
7	88	0	0
8	150	50	0
9	88	201	23
10	100	80	15
Média	77	74	10
DP	47	75	12
EPM	15	24	4

ANEXO 23. Valores de IL-10 no soro (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	298	217	38
2	233	54	176
3	242	316	95
4	159	398	149
5	347	87	0
6	73	105	50
7	165	474	56
8	87	238	126
9	121	150	85
10	145	128	29
Média	187	217	80
DP	90	140	56
EPM	28	44	18

ANEXO 24. Valores de IL-10 no soro (pg/ml) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 12 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	54	65	0
2	57	30	0
3	47	92	0
4	55	70	0
5	38	65	0
6	37	30	67
7	68	0	0
8	77	40	25
9	56	51	0
10	45	28	20
Média	53	47	11
DP	13	27	22
EPM	4	9	7

ANEXO 25. Valores de TNF- α , IL-6 e IL-10 no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) do grupo controle (C).

Ratos	TNF/PT	IL-6/PT	IL-10/PT
1	16,94	8,13	3,81
2	12,43	12,98	3,82
3	8,04	14,13	1,93
4	15,03	4,55	2,99
5	15,62	13,21	1,86
6	11,20	10,48	2,77
7	10,25	5,55	2,42
8	10,00	6,23	2,62
9	12,20	8,12	2,71
10	13,50	9,01	1,95
Média	12,52	9,24	2,69
DP	2,79	3,37	0,71
EPM	0,88	1,07	0,22

ANEXO 26. Valores de TNF- α no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	32,04	52,75	21,40
2	28,80	29,18	21,40
3	96,80	55,96	51,07
4	53,60	27,92	17,82
5	32,39	32,33	9,63
6	50,33	65,03	13,64
7	18,65	24,37	22,36
8	56,11	30,08	10,90
9	31,34	52,96	20,94
10	49,87	49,37	42,16
Média	44,99	42,00	23,13
DP	22,12	14,62	13,35
EPM	6,99	4,62	4,22

ANEXO 27. Valores de TNF- α no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	19,35	20,91	2,57
2	36,62	58,28	29,40
3	31,16	20,10	15,85
4	14,13	14,73	7,16
5	29,92	41,07	10,63
6	63,91	24,49	11,01
7	18,86	60,36	18,28
8	64,14	22,94	28,77
9	35,10	16,82	21,25
10	27,89	56,40	15,21
Média	34,11	33,61	16,01
DP	17,36	18,49	8,75
EPM	5,49	5,85	2,77

ANEXO 28. Valores de IL-6 no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	56,62	25,31	20,57
2	20,22	23,42	19,33
3	29,97	18,49	14,83
4	75,14	25,92	24,25
5	33,49	63,71	10,39
6	29,07	50,26	20,23
7	36,81	20,19	18,66
8	66,97	52,62	18,98
9	45,28	38,00	19,27
10	47,20	36,48	20,01
Média	44,08	35,44	18,65
DP	17,69	15,56	3,70
EPM	5,59	4,92	1,17

ANEXO 29. Valores de IL-6 no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	12,59	30,39	7,01
2	29,44	15,32	4,19
3	24,89	18,34	10,97
4	18,07	18,99	4,75
5	21,45	17,06	17,48
6	59,42	12,56	9,56
7	19,59	36,67	10,02
8	16,12	18,85	4,29
9	26,31	14,76	18,84
10	24,15	15,17	9,82
Média	25,20	19,81	9,69
DP	13,04	7,65	5,13
EPM	4,12	2,42	1,62

ANEXO 30. Valores de IL-10 no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 2 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	14,09	14,13	18,36
2	10,51	17,02	31,28
3	3,50	4,93	20,46
4	23,17	9,45	12,65
5	10,64	30,32	14,36
6	12,06	11,97	25,89
7	9,68	3,29	2,77
8	17,20	4,04	5,90
9	21,23	14,94	22,07
10	23,91	25,54	10,36
Média	14,60	13,56	16,41
DP	6,64	9,00	8,91
EPM	2,10	2,85	2,82

ANEXO 31. Valores de IL-10 no tecido pancreático (pg/mg de proteínas) dos grupos Sem Tratamento (ST), Solução Salina Fisiológica (SSF) e Solução Salina Hipertônica (SSH) 24 horas após a indução da PA.

Ratos	ST	SSF	SSH
1	6,20	9,33	8,88
2	7,51	26,14	2,63
3	20,83	9,87	3,66
4	10,29	4,75	9,84
5	11,87	3,38	28,43
6	20,24	7,43	7,59
7	14,86	3,21	8,96
8	8,98	17,23	3,41
9	15,95	18,74	14,88
10	5,60	8,52	13,22
Média	12,23	10,86	10,15
DP	5,53	7,52	7,60
EPM	1,75	2,30	2,40

ANEXO 32. Valores de MPO no tecido pancreático 2 horas após a indução da PA.

Ratos	C	ST	SSF	SSH
1	0,004	0,020	0,063	0,020
2	0,006	0,017	0,034	0,024
3	0,005	0,026	0,013	0,019
4	0,003	0,029	0,096	0,015
5	0,007	0,014	0,012	0,027
6	0,004	0,021	0,018	0,022
7	0,006	0,047	0,014	0,029
8	0,005	0,054	0,006	0,030
9	0,005	0,030	0,015	0,042
10	0,008	0,038	0,020	0,040
Média	0,005	0,030	0,029	0,027
DP	0,002	0,013	0,029	0,009
EPM	0,001	0,004	0,009	0,003

ANEXO 33. Valores de MPO no tecido pancreático 24 horas após a indução da PA

Ratos	ST	SSF	SSH
1	0,054	0,073	0,080
2	0,022	0,085	0,060
3	0,040	0,050	0,065
4	0,085	0,029	0,080
5	0,062	0,024	0,025
6	0,080	0,038	0,037
7	0,110	0,055	0,046
8	0,036	0,062	0,081
9	0,035	0,140	0,083
10	0,046	0,050	0,033
Média	0,057	0,061	0,059
DP	0,027	0,034	0,022
EPM	0,009	0,011	0,007

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Bradley EL 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga., September 11 through 13, 1992. *Arch Surg*. 1993;128(5):586-90.
2. Halonen KI, Leppäniemi AK, Puolakkainen PA, Lundin JE, Kemppainen EA, Hietaranta AJ, Haapiainen RK. Severe acute pancreatitis: prognostic factors in 270 consecutive patients. *Pancreas*. 2000;21(3):266-71.
3. Company L, Sáez J, Martínez J, Aparicio JR, Laveda R, Grinó P, Pérez-Mateo M. Factors predicting mortality in severe acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2003;3(2):144-8.
4. Werner J, Hartwing W, Uhl W, Müller C, Büchler MW. Useful markers for predicting severity and monitoring progression of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2003;3(2):115-27.
5. Cunha JEM, Machado MCC, Jukemura J. Acute pancreatitis. In: Bland K.I.; Sarr MG et al. General Surgery. 2nd ed. Principles and International Practice. London: Springer, 2009:1161-1169.
6. Bank S, Indaram A. Causes of acute and recurrent pancreatitis. Clinical considerations and clues to diagnosis. *Gastroenterol Clin North Am*. 1999;28(3):571-89.
7. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol*. 2000;30(4):343-56.

-
8. Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet*. 2008;371(9607):143-52.
 9. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci*. 1986;31(3):314-21.
 10. Bettinger JR, Grendell JH. Intracellular events in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Pancreas*. 1991;6(Suppl 1): S2-6.
 11. Glasbrenner B; Adler G. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. 1993;40(6):517-21.
 12. Steer M L. The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas*. 1998;17(1):31-7.
 13. van Acker GJ, Perides G, Steer ML. Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(13):1985-90.
 14. Machado MC, Bacchella T, Cunha JE, Jukemura J, Penteado S, Giovanolli AC, Pinotti HW. Evolução das necroses pancreáticas. Influência do fator infecção. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1985;40(3):120-4.
 15. Cunha JEM, Machado MC, Penteado S, Jukemura J, Bacchella T, Pinotti HW. Pancreatic necrosis in Brazil. In: Bradley III E.L., eds. *Acute Pancreatitis: Diagnosis and Therapy*. New York: Raven Press, 1994:121-5.
 16. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg*. 1997;21(2):130-5.
 17. Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HG. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Pancreatology*. 2001; 1(1): 63-8.
 18. Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carter R, Di Magno E, Banks PA, Whitcomb DC, Dervenis C, Ulrich CD, Satake K,

- Ghaneh P, Hartwing W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Büchler MW, International Association of Pancreatology. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology*. 2002;2(6):565-73.
19. Rau B; Bothe A; Beger HG. Surgical treatment of necrotizing pancreatitis by necrosectomy and closed lavage: changing patient characteristics and outcome in a 19-year, single-center series. *Surgery*. 2005;138(1):28-39.
20. Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. *Ann Surg*. 1995;221(6):625-31.
21. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 1995;82(1):6-13.
22. Jancar S, Abdo EE, Sampietre SN, Kwasniewski F, Coelho AM, Bonizzia A, Machado MC. Effect of PAF antagonists on cerulein-induced pancreatitis. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1995;11(1):41-9.
23. Weidenbach H, Lerch MM, Gress TM, Pfaff D, Turi S, Adler G. Vasoactive mediators and the progression from oedematous to necrotising experimental acute pancreatitis. *Gut*. 1995;37(3):434-40.
24. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*. 1998;175(1):76-83.
25. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol*. 1999;377(1):1-11.
26. Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nüssler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg*. 2000;231(3):352-60.

27. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001;2(4):496-501.
28. Coelho AM, Machado MC, Cunha JE, Sampietre SN, Abdo EE. Influence of pancreatic enzyme content on experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2003;26(3):230-4.
29. Coelho AM, Machado MC, Sampietre SN, Leite KR, Oliveira VL, Pinotti HW. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(8):947-53.
30. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiology implications. *Gut*. 2000;47(4):546-52.
31. Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okajima K, Okamoto K, Ogawa M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000;21(2):141-6.
32. Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2001;8(3):195-203.
33. De Campos T, Deree J, Coimbra R. From acute pancreatitis to end-organ injury: mechanisms of acute lung injury. *Surg Infect*. 2007;8(1):107-20.
34. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *Surg Clin North Am*. 2007;87(6):1325-40.
35. Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS, Knowles CH, Leite KR, Jancar S, Monteiro Cunha JEM, Machado MC. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg*. 2001;5(4):364-70.

-
36. Montagnini AL, Kubrusly MS, Coelho AM, Molan NAT, Cunha JE, Machado MCC, Pinotti HW. Efeito do omeprazol sobre o conteúdo pancreático de enzimas em ratos. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1995;50(5):272-5.
37. Abdo EE, Machado MC, Coelho AM, Sampietre SN, Leite KR, Molan NA. Antioxidative effect of N2-mercaptopropionylglycine (N2-MPG) in experimental acute pancreatitis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1998;53(4):169-73.
38. Salem MZ, Cunha JE, Coelho AM, Sampietre SN, Machado MC, Penteadó S, Abdo EE. Effects of octreotide pretreatment in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2003;3(2):164-8.
39. Almeida JL, Jukemura J, Coelho AM, Patzina RA, Machado MC, Cunha JE. Inhibition of cyclooxygenase-2 in experimental severe acute pancreatitis. *Clinics*. 2006;61(4):301-6.
40. Matheus AS, Coelho AM, Jukemura J, Sampietre SN, Patzina RA, Cunha JE, Machado MC. Effect of inhibition of prostaglandin E2 production on pancreatic infection in experimental acute pancreatitis. *HPB*. 2007;9(5):392-7.
41. Almeida JL, Sampietre SN, Coelho AM, Molan NA, Machado MC, Cunha JE, Jukemura J. Statin pretreatment in experimental acute pancreatitis. *JOP*. 2008;9(4):431-9.
42. Matheus AS, Coelho AM, Sampietre SN, Jukemura J, Patzina RA, Cunha JE, Machado MC. Do the effects of pentoxifylline on inflammation process and pancreatic infection justify its use in acute pancreatitis? *Pancreatology*. 2009;9(5):687-93.
43. Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, Sampietre SN, Molan NA, Soriano F, Matheus AS, Patzina RA, Cunha JE, Velasco I. Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006;32(1):80-6.

44. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1980;239(5): H664-73.
45. Rocha e Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics*. 2005;60(2):159-72.
46. Oliveira RP, Velasco I, Soriano F, Friedman G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care*. 2002; 6(5): 418-23.
47. Kolsen-Petersen JA. Immune effect of hypertonic saline: fact or fiction? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48(6):667-78.
48. Mazzoni MC, Borgström P, Arfors KE Intaglietta M. Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage. *Am J Physiol*. 1988;225(3Pt2):H629-37.
49. Kien ND, Reitan JA, White DA, Wu CH, Eisele JH. Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs. *Circ Shock*. 1991;35(2):109-16.
50. Pascual JL, Khwaja KA, Chaudhury P, Christou NV. Hypertonic saline and the microcirculation. *J Trauma*. 2003;54(5):S133-40.
51. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol*. 1998;161(11):6288-96.
52. Angle N, Hoyt DB, Cabello-Passini R, Herdon-Remelius C, Loomis W, Junger WG. Hypertonic saline resuscitation reduces neutrophil margination by suppressing neutrophil L selectin expression. *J Trauma*. 1998;45(1):7-12.
53. Ciesla DJ, Moore EE, Gonzalez RJ, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline inhibits neutrophil (PMN) priming via attenuation of p38 MAPK signaling. *Shock*. 2000;14(3):265-9.

54. Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. *J Trauma*. 2000; 48(3): 388-95.
55. Oreopoulos GD, Bradwell S, Lu Z, Fan J, Khadaroo R, Marshall JC, Li YH, Rotstein OD. Synergistic induction of IL-10 by hypertonic saline solution and lipopolysaccharides in murine peritoneal macrophages. *Surgery*. 2001;130(2):157-65.
56. Ciesla DJ, Moore EE, Musters RJ, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline alteration of the PMN cytoskeleton: implications for signal transduction and the cytotoxic response. *J Trauma*. 2001;50(2):206-12.
57. Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, da Costa Ferreira Novo F, Birolini D. Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2003;54(6):1137-45.
58. Bahrami S, Zimmermann K, Szelényi Z, Hamar J, Scheiflinger F, Redl H, Junger WG. Small-volume fluid resuscitation with hypertonic saline prevents inflammation but not mortality in a rat model of hemorrhagic shock. *Shock*. 2006;25(3):283-9.
59. Fernandes TR, Pontieri V, Moretti AI, Teixeira DO, Abatepaulo F, Soriano FG, Negri EM, Velasco IT, Souza HP. Hypertonic saline solution increases the expression of heat shock protein 70 and improves lung inflammation early after reperfusion in a rodent model of controlled hemorrhage. *Shock*. 2007;27(2):172-8.
60. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJ, Campisi G, Chaudhury P, Giannias B, Evans DC, Razek T, Michel RP, Christou NV. Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage. *Ann Surg*. 2002;236(5):634-42.
61. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38

mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7420-6.

62. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia J, Jelacic S, Maier RV. Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin. *J Immunol*. 2002;168 (3):1389-96.
63. Powers KA, Woo J, Khadaroo RG, Papia G, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages. *Surgery*. 2003;134(2):312-8.
64. Powers KA, Zurawaska J, Szaszi K, Khadaroo RG, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/reperfusion. *Surgery*. 2005;137(1):66-74.
65. Rizoli SB, Rhind SG, Shek PN, Inaba K, Filips D, Tien H, Brenneman F, Rotstein O. The immunomodulatory effects of hypertonic saline resuscitation in patients sustaining traumatic hemorrhagic shock: a randomized, controlled, double-blinded trial. *Ann Surg*. 2006;243(1):47-57.
66. Bulger EM, Cuschieri J, Warner K, Maier RV. Hypertonic resuscitation modulates the inflammatory response in patients with traumatic hemorrhagic shock. *Ann Surg*. 2007;245(4):635-41.
67. Vassar MJ, Perry CA, Holcroft JW. Prehospital resuscitation of hypotensive trauma patients with 7.5% NaCl versus 7.5% NaCl with added dextran: a controlled trial. *J Trauma*. 1993;34(5):622-32.
68. Younes RN, Aun F, Ching CT, Goldenberg DC, Franco MH, Miura FK, Santos SS, Sequeiros IM, Rocha e Silva M, Fujimura I, Birolini D. Prognostic factors to predict outcome following the administration of hypertonic/hyperoncotic solution in hypovolemic patients. *Shock*. 1997;7(2):79-83.

69. Horton JW, Dunn CW, Burnweit CA, Walker PB. Hypertonic saline-dextran resuscitation of acute canine bile-induced pancreatitis. *Am J Surg*. 1989;158(1):48-56.
70. Schmidt J, Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Lewandrowski KB, Messmer K, Warshaw AL. Hyperoncotic ultrahigh molecular weight dextran solutions reduce trypsinogen activation, prevent acinar necrosis, and lower mortality in rodent pancreatitis. *Am J Surg*. 1993;165(1):40-5.
71. Schmidt J, Huch K, Mithöfer K, Hotz HG, Sinn HP, Buhr HJ, Warshaw AL, Herfarth C, Klar E. Benefits of various dextrans after delayed therapy in necrotizing pancreatitis of the rat. *Intensive Care Med*. 1996;22(11):1207-13.
72. Kondo Y, Nagai H, Kasahara K, Kanazawa K. The therapeutic effect of hypertonic solutions on the changes in the effective circulating plasma volume in acute necrotizing pancreatitis in rats. *Surg Today*. 1998;28(12):1247-53.
73. Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2000;87(10):1336-40.
74. Shields CJ, Sookhai S, Winter DC, Dowdall JF, Kingston G, Parfrey N, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Attenuation of pancreatitis-induced pulmonary injury by aerosolized hypertonic saline. *Surg Infect*. 2001;2(3):215-23
75. Moretti AI, Rios EC, Soriano FG, de Souza HP, Abatepaulo F, Barbeiro DF, Velasco IT. Acute pancreatitis: hypertonic saline solution increases heat shock proteins 70 and 90 and reduces neutrophil infiltration in lung injury. *Pancreas*. 2009;38(5):507-14.
76. Coelho AM, Kubrusly MS, Bonizzia A, Gonzalez Y, Abdo EE, Machado MC. Efeito protetor da depleção de enzimas pancreáticas na evolução da pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1993;48(3):106-11.

77. Machado MC, Coelho AM, 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(4):471-5.
78. Storck G. Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical studies in the rat. *Acta Chir Scand Suppl.* 1971;417:1-36.
79. Lankisch PG, Koop H, Winckler K, Fölsch UR, Creutzfeldt W. Somatostatin therapy of acute experimental pancreatitis. *Gut.* 1977;18(9):713-6.
80. Borgström A, Axelson J, Ihse I, Rehfeld JF. The ratio between anionic and cationic trypsin in rat pancreas varies with CCK stimulation. *Pancreas.* 1995;11(2):179-84.
81. Fernandez-del Castillo C, Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Jehanli A, Patel G, Hermon-Taylor J, Warshaw AL. Generation and possible significance of trypsinogen activation peptides in experimental acute pancreatitis in the rat. *Pancreas.* 1992;7(3):263-70.
82. Schimidt J, Fernandez-del Castillo C, Ratter DW, Lewandrowski K, Compton CC, Warshaw AL. Trypsinogen-activation peptides in experimental rat pancreatitis: prognostic implications and histopathologic correlates. *Gastroenterology.* 1992;103(3):1009-16.
83. Lindkvist B, Wierup N, Sundler F, Borgström A. Long-term nicotine exposure causes increased concentrations of trypsinogens and amylase in pancreatic extracts in the rat. *Pancreas* 2008; 37(13):288-94.
84. Jamieson AD, Pruitt KM, Calwell RC. An improved amylase assay. *J Dental Res.* 1969;48(3):483.
85. Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock.* 2002;17(4): 286-92.

86. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw A. A better model of acute pancreatitis of evaluating therapy. *Ann Surg.* 1992;215(1):44-56.
87. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol.* 1985;59(6):1978-85.
88. Warren JS, Yabroff KR, Mandel DM, Johnson KJ, Ward PA. Role of O₂-in the neutrophil recruitment into site of dermal and pulmonary vasculitis. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(2):163-72.
89. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
90. Altman DG. Practical statistics for medical research. 1st ed. London; New York: Chapman and Hall; 1991.
91. Munro BH. Statistical methods for health care research. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott; 2001.
92. González Y, Machado MC, Silva SM, Bettarello A. Protective effect of a protein-free diet in acute experimental pancreatitis. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(4):477-83.
93. González Y, Coelho AM, Sampietre SN, Machado MC, Bettarello A, Pinotti HW. Dieta hiperlipídica e pancreatite aguda: estudo experimental em ratos. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1989;44(5):232-6.
94. González Y, Coelho AM, Patzina RA, Machado MA, Machado MC, Pinotti HW, Bettarello A. Influência do regime alimentar na evolução tardia da pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1990;45(1):3-9.
95. Coelho AM, Machado MC, Sampietre SN, Leite KR, Molan NA, Pinotti HW. Lesão hepática na pancreatite aguda experimental. Influência da redução da reserva enzimática do pâncreas. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1998;53(3):104-9.

-
96. Alves Jr A, Coelho AM, Sampietre SN, Kubrusly MS, Molan NA, Leite KR, Jancar S, Machado MC, Pinotti HW. Lesão pulmonar na pancreatite aguda. Influência da redução do conteúdo enzimático do pâncreas. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1996;51(2):37-43.
97. Cunha JE, Salem MZ, Coelho AM, Kubrusly MS, Sampietre SN, Machado MC. Influence of pancreatic enzyme content on pulmonary lesions of experimental acute pancreatitis. *HPB*. 2000;2(4):389-93.
98. Lundberg AH, Eubanks JW 3rd, Henry J, Sabek O, Kotb M, Gaber L, Norby-Teglund A, Gaber AO. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas*. 2000;21(1):41-51.
99. Satoh A, Shimosegawa T, Masamune A, Fujita M, Koizumi M, Toyota T. Ascitic fluid of experimental severe acute pancreatitis modulates the function of peritoneal macrophages. *Pancreas*. 1999;19(3):268-75.
100. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, Qiu-Feng H, Egawa S, Sunamura M, Matsuno S. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery*. 2002;132(1):86-92.
101. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, Qiu-Feng H, Shimamura H, Yamauchi J, Egawa S, Sunamura M, Yagi H, Endo Y, Matsuno S. Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas*. 2003;27(3):253-60.
102. Machado MC, Coelho AM, Martins JO, Sampietre SN, Molan NA, Patzina RA, Machado MA, Jancar S. CO2 abdominal insufflation decreases local and systemic inflammatory response in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. In press 2009.
103. Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*. 1995;130(9):966-70.

104. Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci*. 1997;42(8):1783-8.
105. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1853-62.
106. Hatanaka E, Shimomi FM, Curi R, Campa A. Sodium chloride inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils and mononuclear cells. *Shock*. 2007;27(1):32-5.
107. Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2003;9(11):2513-18.