ALBERTO LUIZ MONTEIRO MEYER

Alterações cardíacas na pancreatite aguda experimental

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

Programa de: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. José Jukemura

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Meyer, Alberto Luiz Monteiro

Alterações cardíacas na pancreatite aguda experimental / Alberto Luiz Monteiro Meyer. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: José Jukemura.

Descritores: 1.Pancreatite necrosante aguda 2.Cardiopatias 3.Citocinas
4.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-168/13

Dedicatória

À minha mãe Maria Lucia, por ter me proporcionado uma criação primorosa fundamentada no amor, sendo esta o reflexo de tudo que tenho e sou hoje. Todas as minhas inspirações.

Ao meu pai Antonio Carlos, por toda sua dedicação e genialidade, transmitindo-me diariamente lições de amor, humanidade, humildade e Medicina. Toda a minha admiração.

À minha irmã Mariana, pelo amor, amizade e conselhos nos momentos hesitantes.

À minha avó Mariana, demonstração de longevidade e perseverança, um exemplo a ser seguido.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. José Jukemura, por ser meu mestre, pelos preciosos ensinamentos e pela imensa oportunidade de ter trabalhado ao seu lado. Brilhante médico e pesquisador, pessoa sensível e humana, sempre demonstrou amizade e me conduziu com sabedoria e incentivo ao longo destes quatro anos.

À querida Dra. Marcia Kubrusly, por sua valiosa colaboração e sugestões em todas as fases da realização deste estudo. Bioquímica exemplar, exímia pesquisadora e didata por vocação, agradeço pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, por sua imensa dedicação, competência e comprometimento. Sempre com boa disposição, entusiasmo e brilhantismo, auxiliou na concretização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha, pesquisador e mestre competente com quem tive a imensa satisfação de trocar idéias e ouvir sugestões.

Aos Drs. Andre Luis Montagnini, Sonia Penteado, Emilio Elias Abdo e Telésforo Bacchella, pela amizade e acolhida no Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do HCFMUSP ao longo de toda pós-graduação.

Aos Profs. Drs. Eleazar Chaib e Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, pela oportunidade, amizade e incentivo na realização deste estudo.

Às Dras. Vera Maria Salemi e Roseli Antunes Patzina, pela compreensão, esforço e dedicação na análise e elaboração dos resultados deste estudo.

Ao Prof. Dr. Charles Mady, pelo auxílio na interpretação cardiológica dos resultados deste estudo.

Às queridas Dra. Ana Maria de Mendonça Coelho, Nilza Aparecida Trindade Molan e Sandra Nassa Sampietre, do Laboratório de Transplante e Cirurgia de Fígado do HCFMUSP (LIM/37), pelo auxílio e por terem me recebido com imenso carinho em seu ambiente de trabalho.

Às queridas amigas Vilma Libério e Myrtes Freire de Lima, pela bondade, carinho e cordialidade presente em todos os momentos de convívio.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

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 2011/09177-5 e bolsa de estudos oferecida pela Fundação Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

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. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação – DBD/FMUSP, 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Símbolos

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE.....	9
3. OBJETIVO.....	9
4. MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	86
8. ANEXOS.....	87
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	micromolar
<	menor que
$\pm$	mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
g	gramas
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

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
ELISA	ensaio imunoenzimático
et al.	e outros
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
IL	interleucina
IMOS	insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas
LIM	Laboratório de Investigação Médica
PA	pancreatite aguda
PAG	pancreatite aguda grave
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
VE	ventrículo esquerdo
DD	diâmetro diastólico
DS	diâmetro sistólico
AE	átrio esquerdo
SIV	espessura do septo interventricular

PP	parede posterior
FS	função sistólica
%Enc. Endo	porcentagem de encurtamento endocárdico
ERP	espessura relativa de parede
TRIV	tempo de relaxamento isovolumétrico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrando a relação entre os mediadores inflamatórios (citocinas séricas) e células inflamatórias e o resultado desta interação no miocárdio.....	7
Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental.....	11
Figura 3. Cateterização transduodenal do ducto biliopancreático do rato com injeção retrógrada de taurocolato de sódio.....	13
Figura 4. Aspectos do duodeno e pâncreas antes da injeção retrógrada de taurocolato de sódio.....	14
Figura 5. Aspectos do duodeno e pâncreas após a injeção retrógrada de taurocolato de sódio.....	15
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a integridade dos RNAs extraídos do tecido cardíaco.....	19
Figura 7. Presença de infiltrado inflamatório agudo septal em tecido pancreático.....	60
Figura 8. Presença de hemorragia permeando ácinos e ilhota pancreática.....	61
Figura 9. Presença de necrose acinar em tecido pancreático.....	62
Figura 10. Presença de necrose gordurosa em tecido pancreático.....	63
Figura 11. Presença de fibras cardíacas apresentando degeneração vacuolar difusa.....	73

Figura 12. Presença de linfócitos ao redor de fibras cardíacas necróticas – spot necrose.....	74
Figura 13. Presença de linfócitos permeando as fibras cardíacas necróticas.....	75
Figura 14. Presença de hemorragia entre as fibras miocárdicas.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados para a análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	20
Tabela 2. Classificação do processo inflamatório do tecido pancreático.....	22
Tabela 3. Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação ao DD e DS.....	26
Tabela 4. Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação à amilase, TNF- α , IL-6 e IL-10.....	41
Tabela 5. Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação a expressão de RNAm IL-6, TGF- β e TNF- α	47
Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação aos escores do edema, necrose acinar, infiltrado inflamatório e necrose gordurosa do pâncreas.....	54
Tabela 7. Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação aos escores de degeneração vacuolar, picnose e perda de núcleos e linfócitos no coração.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação gráfica da frequência cardíaca.....	27
Gráfico 2. Representação gráfica do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.....	28
Gráfico 3. Representação gráfica do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.....	29
Gráfico 4. Representação gráfica do septo interventricular.....	30
Gráfico 5. Representação gráfica da parede posterior do ventrículo esquerdo.....	31
Gráfico 6. Representação gráfica da fração de encurtamento.....	32
Gráfico 7. Representação gráfica da fração de ejeção.....	33
Gráfico 8. Representação gráfica do diâmetro sistólico do átrio esquerdo.....	34
Gráfico 9. Representação gráfica do tempo de relaxamento isovolumétrico.....	35
Gráfico 10. Representação gráfica do tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido.....	36
Gráfico 11. Representação gráfica da relação entre as velocidades diastólicas regionais.....	37
Gráfico 12. Representação gráfica da variável IDM (índice de desempenho do miocárdio).....	38

Gráfico 13. Representação gráfica da relação entre fração de encurtamento e IDM.....	39
Gráfico 14. Representação gráfica dos níveis séricos de amilase.....	42
Gráfico 15. Representação gráfica dos níveis séricos de TNF- α	43
Gráfico 16. Representação gráfica dos níveis séricos de IL-6.....	44
Gráfico 17. Representação gráfica dos níveis séricos de IL-10.....	45
Gráfico 18. Representação gráfica da expressão de RNAm IL-6.....	48
Gráfico 19. Representação gráfica da expressão de RNAm TGF- β	49
Gráfico 20. Representação gráfica da expressão de RNAm TNF- α	50
Gráfico 21. Diagrama de dispersão unidimensional do escore do edema.....	55
Gráfico 22. Diagrama de dispersão unidimensional do escore da necrose acinar.....	56
Gráfico 23. Diagrama de dispersão unidimensional do escore do infiltrado inflamatório.....	57
Gráfico 24. Diagrama de dispersão unidimensional do escore de hemorragia.....	58
Gráfico 25. Diagrama de dispersão unidimensional do escore de necrose gordurosa.....	59
Gráfico 26. Diagrama de dispersão unidimensional do escore da degeneração vacuolar.....	67

Gráfico 27. Diagrama de dispersão unidimensional do escore da necrose de coagulação.....68

Gráfico 28. Diagrama de dispersão unidimensional do escore do edema.....69

Gráfico 29. Diagrama de dispersão unidimensional do escore da picnose e perda de núcleos.....70

Gráfico 30. Diagrama de dispersão unidimensional do escore do spot necrose.....71

Gráfico 31. Diagrama de dispersão unidimensional do escore dos linfócitos.....72

RESUMO

MEYER, ALM. Alterações Cardíacas na Pancreatite Aguda Experimental [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Introdução: Vários são os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resposta local e sistêmico na pancreatite aguda. O sistema cardiovascular pode ser afetado durante todo o curso clínico da pancreatite aguda. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção local de citocinas pelo miocárdio, assim como, as alterações funcionais e histológicas do miocárdio na pancreatite aguda grave. **Métodos:** Os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1: controle; Grupo 2: controle operado; Grupo 3: pancreatite aguda grave. Foram medidos os níveis séricos de amilase e de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10), expressão de RNAm de TNF- α , IL-6 e TGF- β e ecocardiograma com avaliação da função cardíaca. Alterações do tecido cardíaco foram analisadas pelo exame histológico. **Resultados:** Os níveis séricos de TNF- α e IL-10 foram significativamente maiores no grupo pancreatite aguda 2h. Os níveis de RNAm de IL-6 do grupo pancreatite aguda 2h foram estatisticamente superiores. Os níveis de RNAm do TNF- α do grupo controle operado e pancreatite aguda 2h foram estatisticamente menores. Mudanças significativas no diâmetro do ventrículo esquerdo foram encontradas nos grupos pancreatite aguda 2h e 12h. Houve alterações estatísticas para a degeneração vacuolar, picnose e perda de núcleo, e os linfócitos. **Conclusão:** Encontramos alterações cardíacas e histológicas compatíveis com o processo inflamatório desencadeado por

pancreatite aguda grave com o incremento da produção de citocinas pelo miocárdio.

Descritores: Pancreatite necrosante aguda, Cardiopatias, Citocinas, Ratos Wistar

SUMMARY

MEYER, ALM. Myocardial Alterations in Experimental Acute Pancreatitis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Background: Several mechanisms are involved in the development of the local and systemic response in acute pancreatitis. Cardiovascular system may be affected throughout the clinical course of acute pancreatitis. The aim was to evaluate local myocardial cytokine production, as well as, functional and histological myocardial alterations in severe acute pancreatitis. **Methods:** The animals were divided into three groups: Group 1: control; Group 2: sham; Group 3: severe acute pancreatitis. Echocardiographic assessment of cardiac function, serum levels of amylase and cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10), and mRNA expression of TNF- α , IL-6 and TGF- β were measured. Myocardial tissue alterations were analysed by histological examination. **Results:** The serum TNF- α , and IL-10 levels were significant higher in acute pancreatitis 2h group. The mRNA IL-6 levels from acute pancreatitis 2h group were statistically higher. The mRNA TNF- α levels from sham group and acute pancreatitis 2h group were statistically lower. Significant changes in the left ventricular diameter were found in acute pancreatitis 2h and 12h groups. There were statistical changes for vacuolar degeneration, pichnosis and loss of nucleus, and lymphocytes. **Conclusion:** We found cardiac and histological changes compatible with the inflammatory process triggered by severe acute pancreatitis with the promotion of local myocardial cytokine production.

Keywords: Acute necrotizing pancreatitis, Heart diseases, cytokines,
Wistar rats

1. INTRODUÇÃO

Clinicamente, a pancreatite aguda (PA) caracteriza-se por dor abdominal acompanhada por elevação sérica de enzimas pancreáticas sendo que sua incidência varia conforme a região, porém acredita-se que seja de cinco a 80 casos por 100.000 habitantes, resultando em mais de 200.000 hospitalizações anuais nos EUA (1).

No Brasil, a incidência é de 15,9 casos por ano para cada 100.000 habitantes, segundo dados de 2006 do DATASUS e IBGE. Segundo o DATASUS, em 2006 foram registrados 1999 casos de PA na cidade de São Paulo, provenientes de 201 Centros de Internação, com média de 2,5 casos graves por centro por ano (2).

Na maioria dos pacientes, apresenta-se como uma doença autolimitada, porém em alguns pode se manifestar sob forma clínica grave evoluindo com insuficiência de múltiplos órgãos (IMO), com elevados índices de morbimortalidade (3-6).

Consequentemente, visando facilitar a compreensão e correlação dos achados observados pelos gastroenterologistas, patologistas, radiologistas e cirurgiões, uma classificação se fez necessária para possibilitar a identificação daqueles pacientes que teriam pior evolução. Desta maneira, diferentes populações de pacientes poderiam se beneficiar no planejamento do tratamento.

Em 1992, na cidade de Atlanta-EUA, foi realizado um encontro internacional com pesquisadores conceituados da área, organizado por Bradley (7), no sentido de se uniformizar definições, conceitos e de se obter um sistema de classificação universalmente aceito baseado em critérios clínicos e de anatomia patológica.

O resultado deste encontro foi a classificação da PA em leve e grave, denominando pancreatite aguda grave (PAG) quando um dos seguintes critérios forem observados: 1) IMO, definida como um ou mais dos seguintes itens: insuficiência pulmonar (pressão parcial de oxigênio arterial $\geq$ 60 mmHg), insuficiência renal (creatinina sérica $>$ 2 mg/dL após reidratação), sangramento do trato gastrointestinal ($>$ 500 mL em 24 horas) e choque (pressão arterial sistólica $<$ 90 mmHg); 2) complicações locais, tais como pseudocisto, abscesso ou necrose pancreática; 3) pelo menos três dos critérios de Ranson; 4) pelo menos 8 pontos no APACHE II (8). Entretanto, os critérios são utilizados infreqüentemente ou de maneira inadequada no contexto clínico devido a variabilidade e ambiguidade de suas definições nos vários componentes individuais (9,10).

Em 2013, um consenso global foi publicado incluindo a participação de especialistas internacionais (11). Estes autores revisaram o Sistema de Classificação de Atlanta para melhorar a avaliação clínica e o tratamento da PA e esclarecer os termos apropriados nas coleções peripancreática, necrose pancreática e peripancreática, e a evolução ao longo do tempo.

Algumas evidências sugerem que a mortalidade na PA, na ausência de IMO, seja negligenciada, o que significa que morte em doentes com PA necrotizante está relacionada com IMO e, não somente, com a necrose (12). Desta maneira, a classificação de Atlanta não consegue distinguir a gravidade entre a presença de IMO e complicações locais, como necrose, abscesso e pseudocisto (13).

Devido a gravidade de algumas PA e suas consequências, os fatores envolvidos na sua etiologia foram amplamente estudados. Entre os vários fatores etiológicos da PA, o cálculo biliar e a ingestão de álcool constituem aqueles mais freqüentes, sendo que os mecanismos exatos de como estes agentes iniciam a

pancreatite ainda não é bem compreendido. Outras causas menos freqüentes incluem medicamentos, hipertrigliceridemia, defeitos genéticos, tumores, infecções virais, hipercalcemia e pós-colangiopancreatografia endoscópica retrógrada.

Independente de sua etiologia, um dos eventos mais precoces na PA é a ativação intra-acinar da tripsina que, posteriormente, desencadeia a ativação de outras enzimas pancreáticas com conseqüente alteração na microcirculação pancreática e peripancreática.

As alterações da microcirculação do tipo vasoconstrição, estase, diminuição da saturação de oxigênio e isquemia progressiva, determinam inicialmente aumento da permeabilidade vascular e edema. Quando a lesão vascular é de intensidade maior, ocorrem lesão e rompimento das membranas celulares, causando, além do edema, necrose e hemorragia do parênquima pancreático e de tecidos peripancreáticos (14). A intensidade e extensão da necrose pancreática e/ou peripancreática e a presença de infecção estão diretamente correlacionadas com a evolução e quadro clínico do doente (15-18).

Ainda na fase inicial da PA, a ativação do complemento leva a quimiotaxia de leucócitos e a ativação de neutrófilos e macrófagos causa a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), metabólitos do ácido aracdônico (prostaglandinas, fator de ativação plaquetária e leucotrienos), enzimas proteolíticas e lipolíticas e espécies reativas de oxigênio que agem como mediadores das manifestações locais e sistêmicas na PA correlacionando com a gravidade da doença (19,20).

Em particular, as concentrações séricas de IL-1 β , TNF- α e IL-6 encontram-se significativamente elevadas na PAG, principalmente nos casos com complicações pulmonares e falência renal (21-24).

Ao mesmo tempo, este processo inflamatório também desencadeia o fenômeno de reparação tissular com ativação de vários mediadores, entre eles os fatores de crescimento como TGF- β , que é responsável pela modulação da síntese de colágeno (tipos I e III), a fibrinogênese e depósito de colágeno. Este fator também é liberado no início da PA e durante a fase de recuperação, desempenhando um importante papel na regulação do mecanismo de reparo celular (25).

A progressão da PA tem como consequência a lesão enzimática e isquêmica de órgãos distantes, que podem acarretar em disfunções respiratórias, cardiovasculares, renais e imunológicas semelhante ao que ocorre na sepse ou no trauma grave (26,27). Estas complicações sistêmicas são raras e de menor gravidade nos pacientes que não apresentam necrose pancreática e peripancreática, entretanto, cerca de metade dos pacientes com PA necrótica desenvolvem falência orgânica.

Complicações pulmonares são relacionadas como um dos eventos mais freqüentemente encontrados na PAG, determinando disfunções respiratórias relacionadas como uma das principais causas de morte na fase inicial da PA (28). Na PA experimental, a lesão pulmonar ocorre 12 horas após o início da indução, com aumento da permeabilidade vascular (29), edema e infiltrado inflamatório provocando diminuição na capacidade pulmonar total (30).

As células acinares produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio na fase inicial da PA, desempenhando um importante papel na patogênese da PA com estímulo de leucócitos e liberação de interleucinas pró-inflamatórias. Modelos experimentais de PA demonstraram associação destes eventos com dano ao hepatócito e apoptose (31,32).

O sistema cardiovascular pode ser afetado durante todo o curso clínico da PA com anormalidades do ritmo e contratilidade cardíaca e do tônus vasomotor dos vasos periféricos (33). Durante a evolução da PAG ocorre hipovolemia e redução da pré-carga podendo também ter como consequência isquemia e danos ao miocárdio. Estas alterações podem ser explicadas parcialmente pela presença de peptídeos vasoativos e de fator de depressão do miocárdio (34,35).

Niu et al. (36) formularam a hipótese de que a presença de citocinas séricas, dos mediadores lipídicos de enzimas liberadas e das espécies reativas de oxigênio induzida por um processo inflamatório, poderiam desencadear produção de citocinas pelo próprio músculo cardíaco causando ulterior dano miocárdico.

Poucos estudos experimentais demonstraram alterações ultraestruturais miocárdicas incluindo edema intersticial, hipertrofia e hipóxia das células do miocárdio, excesso de contratilidade fibromuscular e depósito de colágeno no estroma miocárdico (37,38).

Meador et al. (39) analisaram a resposta do músculo cardíaco do camundongo a um estímulo inflamatório agudo causada por lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina muitas vezes utilizada como modelo experimental para sepse e inflamação sistêmica. Demonstraram que a IL-6 tem um impacto negativo na função

contrátil cardíaca e a IL-1 β em sinergia com TNF- α contribui para a depressão miocárdica durante a sepse.

A secreção de TNF- α e IL-1 β aumenta no coração e pulmão de ratos após a inalação de dióxido de enxofre, indicando que o mecanismo de lesão inflamatória pode ser iniciado pela liberação pulmonar e também cardíaca de citocinas pró-inflamatórias (40).

Células do miocárdio podem produzir TNF- α sob estímulo inflamatório, em particular os mastócitos. Em uma rápida resposta do sistema de defesa do hospedeiro ao estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio, os mastócitos degranulam e liberam TNF- α pré-armazenado que, por sua vez, induzem a produção adicional de TNF- α e fatores inflamatórios, podendo funcionar como um fator regulador cardíaco. Esta cascata de eventos inicia e perpetua a resposta inflamatória durante o infarto do miocárdio, isquemia / reperfusão e sepse (41,42).

A figura 1 ilustra a produção de citocinas pró e antiinflamatórias pelo miocárdio em vigência de um processo inflamatório, no caso, insuficiência cardíaca.

Figura 1 – Esquema demonstrando a relação entre os mediadores inflamatórios (citocinas séricas) e células inflamatórias e o resultado desta interação no miocárdio. A produção de citocinas ativa uma cascata inflamatória que leva a um efeito deletério no músculo cardíaco resultando em acúmulo de colágeno (A) e hipertrofia cardíaca (B). Adaptado de Flores-Arredondo et al. (43).

$TNF-\alpha$ intracelular foi estabelecido como indutor da morte celular cardíaca, principalmente através do estresse oxidativo ativado pela via MAPK p38. Portanto, o

aumento da regulação da expressão do TNF- α no coração em vigência de processo inflamatório pode ser um dos principais contribuintes para apoptose e morte celular cardíaca (44).

O efeito patogênico da resposta inflamatória sobre o coração inclui a indução de estresse oxidativo e, conseqüentemente, lesão com posterior remodelação cardíaca, sugerindo a existência de fibrose cardíaca.

Considerando que na PAG ocorre resposta inflamatória sistêmica, constitui condição fundamental identificar as repercussões, a curto e longo prazo, sobre o miocárdio.

2. HIPÓTESE

A liberação de citocinas inflamatórias na PA estimularia a produção das mesmas no miocárdio capazes de levar a alterações cardíacas funcionais e histológicas.

3. OBJETIVOS

Avaliar em modelo experimental de PAG em ratos:

1. Alterações funcionais do miocárdio avaliadas pela ecocardiografia;
2. Produção de citocinas pró e antiinflamatórias pelo miocárdio;
3. Alterações histológicas no miocárdio.

4. 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.

4.1 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 187/10) e 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.*

4.2 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar (230-250g), 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*.

4.3 Delineamento Experimental

Foram utilizados 36 ratos distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

Grupo controle (n = 6) → ratos sem tratamento. Os animais foram submetidos ao estudo ecocardiográfico e, na sequência, coletados materiais para análise histológica e determinação bioquímica.

Grupo controle operado ($n = 6$) → ratos submetidos aos mesmos procedimentos dos animais com PA, com exceção da indução da PA. Os animais foram submetidos ao estudo ecocardiográfico e, na seqüência, coletados materiais para análise histológica e determinação bioquímica 2h após o ato operatório.

Grupo PA ($n = 24$) → indução da PA. Os animais foram submetidos ao estudo ecocardiográfico e, na seqüência, coletados materiais para análise histológica e determinação bioquímica as 2, 12 e 24 h e tardiamente com 15 dias (Figura 2).

Ao término do experimento, os animais foram colocados em sacos plásticos brancos próprios para descarte e incinerados conforme as normas e o fluxo da coleta de material biológico desta instituição.

Figura 2 – Representação esquemática do delineamento experimental.

4.4 Indução de PA

A PA foi induzida, após anestesia dos animais com administração de cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Parke-Davis, São Paulo, Brasil), 0,2 ml/100g de peso, através de injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio a 4% (*Taurocholic acid, sodium salt, Sigma-Chemical Company™, St. Louis, USA*) no

ducto biliopancreático, na dose de 0,15 ml por 100 gramas de rato com tempo médio de infusão de 60 segundos (0,10 mL/15 seg) (45).

Após tricotomia abdominal foi realizada abertura da cavidade peritoneal através de incisão mediana infra-xifoídia de aproximadamente 2,0 cm, exteriorização do arco duodenal e pâncreas, punção da porção contra-mesentérica do duodeno com agulha 25x7, cateterização do ducto biliopancreático com cateter de polietileno (*Intracath, PE50, Becton-Dickson, USA*), identificação e oclusão do ducto biliopancreático próximo ao hilo hepático com pinça tipo *bulldog* (pinça vascular) e posterior infusão retrógrada da solução de taurocolato de sódio a 4% (figura 3), fechamento da punção duodenal com ponto em *x* com *nylon 6-0* e fechamento por planos da parede abdominal com *nylon 4-0*.

Figura 3 – Cateterização transduodenal do ducto biliopancreático do rato com injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio (esquema de Storck modificado) (46).

Imediatamente após a infusão de solução de taurocolato de sódio foram observados sinais macroscópicos de inflamação do tecido pancreático como edema e hiperemia (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Aspectos do duodeno e pâncreas antes da injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio. Observa-se o ducto biliopancreático cateterizado (seta A) e ocluído com pinça vascular junto ao hilo hepático (seta B).

Figura 5 – Aspectos do duodeno e pâncreas após a injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio. Observa-se acentuado edema e hiperemia do tecido pancreático e peripancreático (seta).

4.5 Estudo Ecocardiográfico

Os animais de experimentação foram avaliados pela mesma pesquisadora, no Instituto do Coração (InCor – HCFMUSP), especializada em ecocardiograma transtorácico sendo que a mesma desconhecia a que grupo de estudo pertencia cada animal.

O ecocardiograma transtorácico foi realizado após anestesia com injeção intramuscular de xilazina (pré-anestésico, Rompum[®], Bayer SA, São Paulo, Brasil) e cloridrato de cetamina 5% (Ketalar[®], Cristália, São Paulo, Brasil) numa dose de 4 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Foi utilizado o equipamento Sequoia 512 (*Acuson, Mountain View, CA, USA*) com transdutor eletrônico de 14 MHz para medir as estruturas cardíacas. As imagens foram obtidas em modo monodimensional (modo-M), orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição paraesternal eixo curto.

A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral na localização dos músculos papilares. A imagem do átrio esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M na localização do plano da valva aórtica.

As seguintes variáveis cardíacas foram medidas: diâmetro diastólico e sistólico do VE (DD e DS, respectivamente), diâmetro do átrio esquerdo (AE), espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior (PP).

A função sistólica (FS) do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico, %Enc. Endo = $[(DD - DS) / DD \times 100]$, e pela espessura relativa de parede (ERP), que é a variação entre os valores diastólico e sistólico da fórmula $[(\text{diâmetro VE} + \frac{1}{2} \text{ espessura do septo interventricular} + \frac{1}{2} \text{ espessura da parede posterior}) \times 100]$.

A massa do VE foi calculada segundo a fórmula $0,8 \times \{1,04 [(DD + SIV + PP)^3 - DD^3]\} + 0,6\text{g}$; na qual o valor 1,04 indica a densidade específica do miocárdio. A massa do VE foi normalizada para o peso corporal (47).

4.6 Coleta dos materiais para análise

Os animais, após estudo ecocardiográfico, foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 40 mg/Kg. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca e, posteriormente, retirados o pâncreas e coração para a realização dos estudos histológicos e de expressão gênica.

4.6.1 Dosagem de amilase

A determinação da atividade da amilase foi realizada no soro pelo método colorimétrico de Jamieson (48) e os resultados foram expressos em U/ml, sendo

que 1 unidade de atividade de amilase corresponde a 1 μmol de maltose liberada/min.

4.6.2 Dosagem dos mediadores inflamatórios

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas no soro após centrifugação a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes estocados a -80°C.

A determinação quantitativa dos mediadores inflamatórios foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) através da utilização do *kit* comercial da *Biosource International Cytoscreen*TM. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.6.3 Análise da expressão gênica no tecido cardíaco

4.6.3.1 Extração de RNA total

O tecido cardíaco (50mg) foi fragmentado utilizando-se almofariz e pistilo com nitrogênio líquido. Ao material pulverizado era adicionado 1,0 mL de Trizol[®] (solução ácida monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina/ *Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, USA*). Para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas era adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Merck) para 1,0 mL de Trizol[®]. Os tubos foram fechados e agitados manualmente por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Centrifugaram-se as amostras durante 15 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Após a centrifugação, observa-se a formação de três fases: a mais inferior fenólica (proteínas), a fase intermediária (DNA) e a superior aquosa (RNA), na qual o volume é constituído por aproximadamente 60% do volume do Trizol[®] acrescentado ao material pulverizado.

A fase aquosa foi transferida para novo tubo de microcentrífuga e adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico gelado (Merck) para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 min e centrifugadas a 12.000

rpm durante 10 min a 4 °C. Removido o sobrenadante e realizado lavagens do precipitado de RNA com 1,0 mL de etanol 75%. Centrifugou-se por 5 min a 10.000 rpm a 4 °C. O RNA sedimentado no fundo do tubo foi ressuspendido em 50 a 100 µL de água ultrapura estéril livre de DNase/RNase (Invitrogen).

A concentração dos RNAs extraídos foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA*) pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, utilizado como valor padrão 1 DO₂₆₀=40 µg/mL de RNA. O grau de pureza foi avaliado pela relação 260/280 nm, tendo sido utilizados os RNAs cuja relação foi $\geq 1,8$. Para verificar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio 3,0 µg/mL e visualização em transiluminador de luz UV em comprimento de onda 203 nm. A Figura 6 ilustra a análise da integridade e pureza dos RNAs totais extraídos.

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a integridade dos RNAs extraídos do tecido cardíaco (exemplo de amostra de RNA de cada um dos grupos) com visualização das bandas 28S e 18S.

4.6.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de TNF- α , IL-6, TGF- β do miocárdio foi realizada nos grupos controle, controle operado e PA com 2 e 12h e 15 dias. Determinada por qRT-PCR no termociclador Rotor-Gene RG-3000 (*Corbett Research, Sidney, Australia*). Foi utilizado o *kit* comercial *SuperScript™ III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR* (*Invitrogen, Life Technologies*) que corresponde à reação realizada em uma única etapa, onde a síntese do cDNA é feita a partir do RNA total da amostra. Para isso, foram utilizados em volume final de 15 μ L: 0,3 μ L de Enzima, 7,5 μ L de Tampão, 0,3 μ L de *primer forward* (F), 0,3 μ L de *primer reverse* (R), 1,6 μ L de Água ultrapura estéril livre de DNase/RNase e 5 μ L de RNA total (20ng). O protocolo de amplificação constituiu-se das seguintes condições: 10 minutos a 50°C e 5 minutos a 95°C, seguindo-se 35

ciclos de 20 segundos à 95°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72°C. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Como controle interno das reações de qRT-PCR foi utilizado o gene de referência (endógeno) β -actina, a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo. Foi utilizado o programa Primer3 para o desenho dos *primers* (Tabela 1) (49).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a análise da expressão gênica por qRT-PCR

Gene	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
TGF- β	5'-CGGCAGCTGTACATTGACTT-3'	5'-AGCGCACGATCATGTTGGAC-3'
IL-6	5'-CTTCACAAGTCGGAGGCTTAAT-3'	5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3'
TNF- α	5'-TGCCTCAGCCTCTTCTCATT-3'	5'-GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
β -actina	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'	5'-GGGGTGTGGAAGGTCTCAAA-3'

TGF- β = fator de crescimento e transformação β ; IL-6 = interleucina 6; TNF- α = fator de necrose tumoral α .

Para o cálculo do nível de expressão de cada gene alvo, utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa (49), onde Ct (*threshold cycle*) é o ciclo da PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase logarítmica, onde ΔCt é a diferença de expressão entre gene alvo e controle endógeno de uma determinada amostra e $\Delta\Delta Ct$ corresponde à diferença entre o ΔCt da amostra e o ΔCt do controle.

A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR):

$$QR = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$$

4.7 Análise histológica do tecido pancreático e cardíaco

A análise histológica foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por patologista especializado em histologia pancreática e miocárdica, sendo que o mesmo desconhecia a que grupo de estudo pertencia cada animal.

Fragmentos da porção duodenal do pâncreas e dos ventrículos do coração dos animais foram fixados em solução de formol a 10% imediatamente após a coleta e encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica, onde foram incluídos em parafina, cortados em espessura de 5 μ , corados através da técnica de hematoxilina-eosina (HE) e observados à microscopia óptica (microscópio Zeiss).

A avaliação do tecido pancreático foi realizada através da utilização de classificação padronizada (51), analisando as seguintes variáveis: edema, necrose acinar, inflamação e infiltrado perivascular, necrose gordurosa e hemorragia (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação do processo inflamatório do tecido pancreático.

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 GORDUOSA	
Ausente	0
1 foco	0,5
2 focos	1
3 focos	1,5
4 focos	2
5 focos	2,5
6 focos	3
7 focos	3,5
8 ou mais focos	4
INFLAMAÇÃO E INFILTRADO PERIVASCULAR	
0-1 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	0
2-5 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	0,5
6-10 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	1
11-15 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	1,5
16-20 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	2
21-25 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	2,5
26-30 leucócitos perivasculares ou intralobulares/CGA	3
>30 leucócitos/CGA ou microabscessos focais	3,5
>35 leucócitos/CGA ou microabscessos confluentes	4

Os cortes histológicos do tecido cardíaco corados pelo HE foram utilizados para a identificação de áreas de necrose de coagulação, degeneração vacuolar,

edema, picnose e perda de núcleos, presença de linfócitos permeando fibras miocárdicas e/ou circulando células necróticas (*spot* necrose). A intensidade da lesão foi classificada pela utilização de escores considerando a porcentagem de campos apresentando as lesões da seguinte forma: ausente = 0 (0%); discreto = 1 (até 25%); moderado = 2 (até 50%) e acentuado = 3 (>50%).

4.8 Análise Estatística

As variáveis morfométricas cardíacas e função diastólica / sistólica do VE (ecocardiograma), mediadores inflamatórios, amilase, expressão de RNAm e histologia foram apresentadas por meio de medidas descritivas (média, mediana, desvio-padrão, valores mínimo e máximo) e por representação gráfica (*Box-Plot* e dispersão unidimensional) (52).

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

1. Análise de variância (ANOVA) com um fator fixo (53) na comparação dos grupos (controle, controle operado, PA 2 horas, PA 12 horas, PA 24 horas e PA 15 dias) segundo:

- medidas obtidas no ecocardiograma [frequência cardíaca (FC), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DD), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DS), septo interventricular (SIV), parede posterior do ventrículo esquerdo (PP), fração de encurtamento (FS), fração de ejeção (EF), diâmetro sistólico do átrio esquerdo (AE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido), relação entre as velocidades diastólicas regionais (E/A), índice de desempenho do miocárdio (IDM) e relação entre fração de

encurtamento e IDM (FS/IDM)], além das comparações múltiplas pelos métodos de Tukey e Dunnett quando necessárias.

- amilase no soro
- expressão gênica (IL-6, TGF- β e TNF- α)

2. Teste de Kruskal-Wallis (54) na comparação dos grupos (controle, controle operado, PA 2 horas, PA 12 horas, PA 24 horas e PA 15 dias) segundo:

- medidas no soro (TNF- α , IL-6 e IL-10)
- escores do edema, necrose acinar, infiltrado inflamatório, hemorragia e necrose gordurosa na região do pâncreas
- escores de degeneração vacuolar, necrose de coagulação, edema, picnose e perda de núcleos, *spot* necrose e linfócitos na região do coração

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância α igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2010 para *Windows* para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19.0 for *Windows* e R-Program versão 2.11.1.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo Ecocardiográfico

No exame de ecocardiograma foram comparados os seguintes dados: frequência cardíaca (FC) (bpm), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DD) (mm), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DS) (mm), septo interventricular (SIV) (mm), parede posterior do ventrículo esquerdo (PP) (mm), fração de encurtamento (FS) (%), fração de ejeção (FE) (%), diâmetro sistólico do átrio esquerdo (AE) (mm), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (mseg), tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido), relação entre as velocidades diastólicas regionais (E/A), IDM (índice de desempenho do miocárdio) e relação entre fração de encurtamento e IDM (FS/IDM) (ver Anexo 1 e Gráficos 1 a 13).

Na comparação dos grupos notamos que o comportamento do DD ($p < 0,001$) e DS ($p = 0,012$) foram estatisticamente diferentes entre os grupos, (ver detalhes na Tabela 3):

- o DD do grupo PA 2 horas foi estatisticamente menor quando comparado aos grupos controle ($p = 0,037$), controle operado ($p = 0,004$), PA 24 horas ($p = 0,018$) e PA 15 dias ($p = 0,008$).

- o DS do grupo PA 15 dias foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo PA 2 horas ($p = 0,007$).

- Houve tendência do grupo PA 2 horas apresentar menor DS quando comparado aos grupos controle ($p = 0,069$) e PA 24 horas ($p = 0,057$).

Tabela 3: Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação ao DD e DS.

DD		DS	
controle = controle operado	0,324	controle = controle operado	0,893
controle > PA 2 horas	0,037	controle = PA 2 horas	0,069
controle = PA 12 horas	0,951	controle = PA 12 horas	0,904
controle = PA 24 horas	0,997	controle = PA 24 horas	>0,999
controle = PA 15 dias	0,434	controle = PA 15 dias	0,975
controle operado > PA 2 horas	0,004	controle operado = PA 2 horas	0,152
controle operado = PA 12 horas	0,333	controle operado = PA 12 horas	0,487
controle operado = PA 24 horas	0,813	controle operado = PA 24 horas	0,959
controle operado = PA 15 dias	0,999	controle operado = PA 15 dias	0,992
PA 2 horas = PA 12 horas	0,775	PA 2 horas = PA 12 horas	0,991
PA 2 horas < PA 24 horas	0,018	PA 2 horas = PA 24 horas	0,057
PA 2 horas < PA 15 dias	0,008	PA 2 horas > PA 15 dias	0,007
PA 12 horas = PA 24 horas	0,785	PA 12 horas = PA 24 horas	0,814
PA 12 horas = PA 15 dias	0,460	PA 12 horas = PA 15 dias	0,486
PA 24 horas = PA 15 dias	0,974	PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999

Dunnett

O mesmo resultado não foi seguido para FC ($p=0,971$), SIV ($p=0,542$), PP ($p=0,496$), FS ($p=0,810$), FE ($p=0,778$), AE ($p=0,069$), TRIV ($p=0,186$), TRIV corrigido ($p=0,248$), E/A ($p=0,574$), IDM ($p=0,251$) e FS/IDM ($p=0,532$), onde notamos comportamento estatisticamente igual entre os grupos.

Gráfico 1: Representação gráfica da frequência cardíaca (FC) (bpm).

Gráfico 2: Representação gráfica do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DD) (mm).

Gráfico 3: Representação gráfica do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DS) (mm).

Gráfico 4: Representação gráfica do septo interventricular (SIV) (mm).

Gráfico 5: Representação gráfica da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP) (mm).

Gráfico 6: Representação gráfica da fração de encurtamento (FS) (%).

Gráfico 7: Representação gráfica da fração de ejeção (FE) (%).

Gráfico 8: Representação gráfica do diâmetro sistólico do átrio esquerdo (AE) (mm).

Gráfico 9: Representação gráfica do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) (mseg).

Gráfico 10: Representação gráfica do tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido).

Gráfico 11: *Representação gráfica da relação entre as velocidades diastólicas regionais (E/A).*

Gráfico 12: Representação gráfica da variável IDM (índice de desempenho do miocárdio).

Gráfico 13: Representação gráfica da relação entre fração de encurtamento e IDM (FS/IDM).

5.2 Dosagem de amilase e mediadores inflamatórios séricos

No soro foram mensurados níveis de amilase (U/ml), TNF- α (pg/ml), IL-6 (pg/ml) e IL-10 (pg/ml) (ver Anexo 2 e Gráficos 14 a 17).

Os resultados inferenciais revelaram que o comportamento da amilase no soro ($p<0,001$), TNF ($p<0,001$), IL-6 ($p<0,001$) e IL-10 ($p<0,001$) não foram estatisticamente os mesmos entre os grupos (ver detalhes na Tabela 4):

- a amilase do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p=0,009$) e PA 15 dias ($p<0,001$). O grupo PA 2 horas apresentou tendência de maior amilase quando comparado ao grupo PA 24 horas ($p=0,072$).

- o TNF do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$), PA 12 horas ($p<0,001$), PA 24 horas ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$).

- a IL-6 do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,0001$), controle operado ($p<0,001$), PA 24 horas ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$). A IL-6 do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,0001$), controle operado ($p<0,001$), PA 24 horas ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$).

- a IL-10 do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,0001$), controle operado ($p<0,001$), PA 12 horas ($p<0,001$), 24 horas ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$). A IL-10 do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,0001$), controle operado ($p<0,001$), PA 24 horas ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$).

Tabela 4: Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação à amilase, TNF- α , IL-6 e IL-10.

amilase ^a		TNF- α ^b	
controle = controle operado	0,832	controle = controle operado	>0,999
controle < PA 2 horas	<0,001	controle < PA 2 horas	<0,001
controle = PA 12 horas	0,403	controle = PA 12 horas	>0,999
controle = PA 24 horas	0,996	controle = PA 24 horas	>0,999
controle = PA 15 dias	>0,999	controle = PA 15 dias	>0,999
controle operado < PA 2 horas	0,009	controle operado < PA 2 horas	<0,001
controle operado = PA 12 horas	0,953	controle operado = PA 12 horas	>0,999
controle operado = PA 24 horas	>0,999	controle operado = PA 24 horas	>0,999
controle operado = PA 15 dias	0,843	controle operado = PA 15 dias	>0,999
PA 2 horas = PA 12 horas	0,479	PA 2 horas > PA 12 horas	<0,001
PA 2 horas = PA 24 horas	0,072	PA 2 horas > PA 24 horas	<0,001
PA 2 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 2 horas > PA 15 dias	<0,001
PA 12 horas = PA 24 horas	0,964	PA 12 horas = PA 24 horas	>0,999
PA 12 horas = PA 15 dias	0,424	PA 12 horas = PA 15 dias	>0,999
PA 24 horas = PA 15 dias	0,998	PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999
IL-6 ^b		IL-10 ^b	
controle = controle operado	>0,999	controle = controle operado	>0,999
controle < PA 2 horas	<0,001	controle < PA 2 horas	<0,001
controle < PA 12 horas	<0,001	controle < PA 12 horas	<0,001
controle = PA 24 horas	>0,999	controle = PA 24 horas	>0,999
controle = PA 15 dias	>0,999	controle = PA 15 dias	>0,999
controle operado < PA 2 horas	<0,001	controle operado < PA 2 horas	<0,001
controle operado < PA 12 horas	<0,001	controle operado < PA 12 horas	<0,001
controle operado = PA 24 horas	>0,999	controle operado = PA 24 horas	>0,999
controle operado = PA 15 dias	>0,999	controle operado = PA 15 dias	>0,999
PA 2 horas = PA 12 horas	0,510	PA 2 horas > PA 12 horas	<0,001
PA 2 horas > PA 24 horas	<0,001	PA 2 horas > PA 24 horas	<0,001
PA 2 horas > PA 15 dias	<0,001	op 2 hora > PA 15 dias	<0,001
PA 12 horas > PA 24 horas	<0,001	PA 12 horas > PA 24 horas	<0,001
PA 12 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 12 horas > PA 15 dias	<0,001
PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999	PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999

^aDunnett, ^bKruskal-Wallis

Gráfico 14: Representação gráfica dos níveis séricos de amilase (U/mL).

Gráfico 15: Representação gráfica dos níveis séricos de TNF- α (pg/mL).

Gráfico 16: Representação gráfica dos níveis séricos de IL-6 (pg/mL).

Gráfico 17: Representação gráfica dos níveis séricos de IL-10 (pg/mL).

5.3 Análise da expressão gênica no tecido cardíaco

O padrão da expressão gênica, medido através dos níveis de RNAm de IL-6, TGF- β e TNF- α no tecido cardíaco, está resumido no Anexo 3 e nos gráficos 18 a 20.

Os resultados inferenciais revelaram que o comportamento da IL-6 ($p < 0,001$), TGF- β ($p < 0,001$) e TNF- α ($p < 0,001$) não foi estatisticamente o mesmo entre os grupos (ver detalhes na Tabela 5):

- a IL-6 do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p = 0,004$), controle operado ($p = 0,001$), PA 12 horas ($p = 0,001$), PA 24 horas ($p = 0,007$) e PA 15 dias ($p = 0,002$).

- o TGF- β do grupo controle foi estatisticamente maior quando comparado ao grupo controle operado ($p = 0,044$). O TGF- β do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p = 0,016$), controle operado ($p < 0,001$), PA 2 horas ($p = 0,003$), PA 24 horas ($p = 0,003$) e PA 15 dias ($p = 0,005$).

- o TNF- α do grupo controle foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle operado ($p = 0,019$) e PA 2 horas ($p = 0,004$). O TNF- α do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle operado ($p = 0,022$) e PA 2 horas ($p = 0,008$). O TNF- α do grupo PA 24 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle operado ($p = 0,008$) e PA 2 horas ($p = 0,008$). O grupo PA 15 dias apresentou tendência de maior TNF- α quando comparado aos grupos controle operado ($p = 0,076$) PA 2 horas ($p = 0,056$).

Tabela 5: Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação à expressão de RNAm IL-6, TGF- β e TNF- α .

IL-6 ^c		TGF- β ^c	
controle = controle operado	0,987	controle > controle operado	0,044
controle < PA 2 horas	0,004	controle = PA 2 horas	0,986
controle = PA 12 horas	0,976	controle < PA 12 horas	0,016
controle = PA 24 horas	>0,999	controle = PA 24 horas	0,975
controle = PA 15 dias	>0,999	controle = PA 15 dias	0,997
controle operado < PA 2 horas	0,001	controle operado = PA 2 horas	0,170
controle operado = PA 12 horas	>0,999	controle operado < PA 12 horas	<0,001
controle operado = PA 24 horas	0,953	controle operado = PA 24 horas	0,202
controle operado = PA 15 dias	0,997	controle operado = PA 15 dias	0,118
PA 2 horas > PA 12 horas	0,001	PA 2 horas < PA 12 horas	0,003
PA 2 horas > PA 24 horas	0,007	PA 2 horas = PA 24 horas	>0,999
PA 2 horas > PA 15 dias	0,002	PA 2 horas = PA 15 dias	>0,999
PA 12 horas = PA 24 horas	0,932	PA 12 horas > PA 24 horas	0,003
PA 12 horas = PA 15 dias	0,993	PA 12 horas > PA 15 dias	0,005
PA 24 horas = PA 15 dias	0,998	PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999
TNF- α ^a			
controle > controle operado	0,019		
controle > PA 2 horas	0,004		
controle = PA 12 horas	>0,999		
controle = PA 24 horas	0,367		
controle = PA 15 dias	0,845		
controle operado = PA 2 horas	0,998		
controle operado < PA 12 horas	0,022		
controle operado < PA 24 horas	0,008		
controle operado = PA 15 dias	0,076		
PA 2 horas < PA 12 horas	0,008		
PA 2 horas < PA 24 horas	0,008		
PA 2 horas = PA 15 dias	0,056		
PA 12 horas = PA 24 horas	0,504		
PA 12 horas = PA 15 dias	0,921		
PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999		

^aDunnett, ^cTukey

Gráfico 18: Representação gráfica da expressão de RNAm IL-6.

Gráfico 19: Representação gráfica da expressão de RNAm TGF- β .

Gráfico 20: Representação gráfica da expressão de RNAm TNF- α .

5.4 Análise histológica dos tecidos pancreático e cardíaco

Os escores do edema, necrose acinar, infiltrado inflamatório, hemorragia e necrose gordurosa obtidos na histologia do pâncreas estão descritivamente resumidos no Anexo 4 e nos gráficos 21 a 25.

Os resultados inferenciais revelaram que os escores do edema ($p<0,001$), necrose acinar ($p<0,001$), infiltrado inflamatório ($p<0,001$) e necrose gordurosa ($p<0,001$) não são estatisticamente os mesmos entre os seis grupos (ver detalhes na Tabela 6).

O escore de hemorragia do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos demais grupos ($p<0,001$).

Para os demais aspectos, notamos que:

- o escore do edema do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$) e controle operado ($p<0,001$), porém menor quando comparado aos grupos PA 12 horas ($p=0,043$) e PA 24 horas ($p<0,001$). O escore do edema do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$), porém menor quando comparado ao grupo PA 24 horas ($p=0,026$). O escore do edema do grupo PA 24 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$). O escore do edema do grupo PA 15 dias foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo PA 2 horas ($p<0,001$). Houve uma tendência do grupo PA 15 dias apresentar maior escore de edema quando comparado aos grupos controle ($p=0,074$) e controle operado ($p=0,074$).

- o escore de necrose acinar do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$), porém menor quando comparado aos grupos PA 12 horas ($p=0,009$) e PA 24 horas ($p<0,001$). O escore de necrose acinar do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$), porém menor quando comparado ao grupo PA 24 horas ($p=0,002$). O escore de necrose acinar do grupo PA 24 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$).

- o escore de infiltrado inflamatório do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$), porém menor quando comparado aos grupos PA 12 horas ($p=0,001$) e PA 24 horas ($p<0,001$). O escore de infiltrado inflamatório do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$), porém menor quando comparado ao grupo PA 24 horas ($p=0,028$). O escore de infiltrado inflamatório do grupo PA 24 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$).

- o escore de necrose gordurosa do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p=0,014$) e controle operado ($p=0,014$), porém menor quando comparado aos grupos PA 12 horas ($p<0,001$) e PA 24 horas ($p<0,001$). O escore de necrose gordurosa do grupo PA 12 horas foi estatisticamente menor quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$) e controle operado ($p<0,001$), porém maior quando comparado ao grupo PA 15 dias ($p<0,001$). O escore de necrose gordurosa do grupo PA 24 horas foi estatisticamente maior

quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$) e PA 15 dias ($p<0,001$).

Tabela 6: Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação aos escores do edema, necrose acinar, infiltrado inflamatório e necrose gordurosa do pâncreas.

edema		necrose acinar	
controle = controle operado	>0,999	controle = controle operado	>0,999
controle < PA 2 horas	<0,001	controle < PA 2 horas	<0,001
controle < PA 12 horas	<0,001	controle < PA 12 horas	<0,001
controle < PA 24 horas	<0,001	controle < PA 24 horas	<0,001
controle = PA 15 dias	0,074	controle = PA 15 dias	>0,999
controle operado < PA 2 horas	<0,001	controle operado < PA 2 horas	<0,001
controle operado < PA 12 horas	<0,001	controle operado < PA 12 horas	<0,001
controle operado < PA 24 horas	<0,001	controle operado < PA 24 horas	<0,001
controle operado = PA 15 dias	0,074	controle operado = PA 15 dias	>0,999
PA 2 horas < PA 12 horas	0,043	PA 2 horas < PA 12 horas	0,009
PA 2 horas < PA 24 horas	<0,001	PA 2 horas < PA 24 horas	<0,001
PA 2 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 2 horas > PA 15 dias	<0,001
PA 12 horas < PA 24 horas	0,026	PA 12 horas < PA 24 horas	0,002
PA 12 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 12 horas > PA 15 dias	<0,001
PA 24 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 24 horas > PA 15 dias	<0,001
infiltrado inflamatório		necrose gordurosa	
controle = controle operado	>0,999	controle = controle operado	>0,999
controle < PA 2 horas	<0,001	controle < PA 2 horas	0,014
controle < PA 12 horas	<0,001	controle < PA 12 horas	<0,001
controle < PA 24 horas	<0,001	controle < PA 24 horas	<0,001
controle = PA 15 dias	0,352	controle = PA 15 dias	0,150
controle operado < PA 2 horas	<0,001	controle operado < PA 2 horas	0,014
controle operado < PA 12 horas	<0,001	controle operado < PA 12 horas	<0,001
controle operado < PA 24 horas	<0,001	controle operado < PA 24 horas	<0,001
controle operado = PA 15 dias	0,352	controle operado = PA 15 dias	0,150
PA 2 horas < PA 12 horas	0,001	PA 2 horas < PA 12 horas	<0,001
PA 2 horas < PA 24 horas	<0,001	PA 2 horas < PA 24 horas	<0,001
PA 2 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 2 horas = PA 15 dias	0,263
PA 12 horas < PA 24 horas	0,028	PA 12 horas = PA 24 horas	0,595
PA 12 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 12 horas > PA 15 dias	<0,001
PA 24 horas > PA 15 dias	<0,001	PA 24 horas > PA 15 dias	<0,001

Kruskal-Wallis

Gráfico 21: Diagrama de dispersão unidimensional do escore do edema.

Gráfico 22: Diagrama de dispersão unidimensional do escore da necrose acinar.

Gráfico 23: Diagrama de dispersão unidimensional do escore do infiltrado inflamatório.

Gráfico 24: Diagrama de dispersão unidimensional do escore de hemorragia.

Gráfico 25: Diagrama de dispersão unidimensional do escore de necrose gordurosa.

As figuras 7 a 10 demonstram as alterações histológicas pancreáticas encontradas entre os grupos estudados.

Figura 7 – Aspecto microscópico de fragmento pancreático de rato após PA (grupo 2h). Presença de infiltrado inflamatório agudo septal em tecido pancreático (HE – 400x).

Figura 8 – Aspecto microscópico de fragmento pancreático de rato após PA (grupo 12h). Presença de hemorragia permeando ácinos e ilhota pancreática (HE – 400x).

Figura 9 – Aspecto microscópico de fragmento pancreático de rato após PA (grupo 24h). Presença de necrose acinar em tecido pancreático (HE – 400x).

Figura 10 – Aspecto microscópico de fragmento pancreático de rato após PA (grupo 15 dias). Presença de necrose gordurosa em tecido pancreático (HE – 400x).

Os escores de degeneração vacuolar, necrose de coagulação, edema, picnose e perda de núcleos, *spot* necrose e linfócitos, obtido na histologia do coração estão resumidos no Anexo 5 e Gráficos 26 a 31.

Notamos através dos resultados inferenciais que os escores da necrose de coagulação ($p=0,099$), edema ($p=0,207$) e *spot* necrose ($p=0,191$) foram estatisticamente os mesmos entre os seis grupos. O mesmo comportamento não foi seguido para a degeneração vacuolar ($p=0,048$), picnose e perda de núcleos ($p=0,034$) e linfócitos ($p=0,001$) (ver detalhes na Tabela 7).

Através das comparações entre os grupos, temos que:

- o escore de degeneração vacuolar do grupo PA 2 horas foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo PA 15 dias ($p=0,040$). O escore de degeneração vacuolar do grupo PA 15 dias foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p=0,002$) e PA 15 dias ($p=0,009$). Houve uma tendência do grupo controle apresentar menor escore de degeneração vacuolar quando comparado aos grupos PA 12 horas ($p=0,068$) e PA 24 horas ($p=0,068$).

- o escore de picnose e perda de núcleos do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p=0,004$), controle operado ($p=0,004$), PA 12 horas ($p=0,047$), PA 24 horas ($p=0,004$) e PA 15 dias ($p=0,040$).

- o escore de linfócitos do grupo PA 2 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$) e controle operado ($p<0,001$). O escore de linfócitos do grupo PA 12 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$), controle operado ($p<0,001$), PA 24 horas ($p=0,022$) e PA 15 dias ($p=0,022$). O escore de linfócitos do grupo PA 24 horas foi

estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p=0,022$) e controle operado ($p=0,022$). O escore de linfócitos do grupo PA 15 dias foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos controle ($p=0,022$) e controle operado ($p=0,022$).

Tabela 7: Resultados das comparações múltiplas entre os seis grupos, com relação aos escores de degeneração vacuolar, picnose e perda de núcleos e linfócitos no coração.

degeneração vacuolar		picnose e perda de núcleos	
controle = controle operado	0,532	controle = controle operado	>0,999
controle = PA 2 horas	0,216	controle < PA 2 horas	0,004
controle = PA 12 horas	0,068	controle = PA 12 horas	0,309
controle = PA 24 horas	0,068	controle = PA 24 horas	>0,999
controle < PA 15 dias	0,002	controle = PA 15 dias	>0,999
controle operado = PA 2 horas	0,532	controle operado < PA 2 horas	0,004
controle operado = PA 12 horas	0,216	controle operado = PA 12 horas	0,309
controle operado = PA 24 horas	0,216	controle operado = PA 24 horas	>0,999
controle operado < PA 15 dias	0,009	controle operado = PA 15 dias	>0,999
PA 2 horas = PA 12 horas	0,532	PA 2 horas > PA 12 horas	0,047
PA 2 horas = PA 24 horas	0,532	PA 2 horas > PA 24 horas	0,004
PA 2 horas < PA 15 dias	0,040	PA 2 horas > PA 15 dias	0,004
PA 12 horas = PA 24 horas	>0,999	PA 12 horas = PA 24 horas	0,309
PA 12 horas = PA 15 dias	0,140	PA 12 horas = PA 15 dias	0,309
PA 24 horas = PA 15 dias	0,140	PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999
linfócitos			
controle = controle operado	>0,999		
controle < PA 2 horas	<0,001		
controle < PA 12 horas	<0,001		
controle < PA 24 horas	0,022		
controle < PA 15 dias	0,022		
controle operado < PA 2 horas	<0,001		
controle operado < PA 12 horas	<0,001		
controle operado < PA 24 horas	0,022		
controle operado < PA 15 dias	0,022		
PA 2 horas = PA 12 horas	0,426		
PA 2 horas = PA 24 horas	0,117		
PA 2 horas = PA 15 dias	0,117		
PA 12 horas > PA 24 horas	0,022		
PA 12 horas > PA 15 dias	0,022		
PA 24 horas = PA 15 dias	>0,999		
Kruskal-Wallis			

Gráfico 26: Diagrama de dispersão unidimensional do escore da degeneração vacuolar.

Gráfico 27: Diagrama de dispersão unidimensional do escore da necrose de coagulação.

Gráfico 28: Diagrama de dispersão unidimensional do escore do edema.

Gráfico 29: Diagrama de dispersão unidimensional do escore da picnose e perda de núcleos.

Gráfico 30: Diagrama de dispersão unidimensional do escore do *spot* necrose.

Gráfico 31: Diagrama de dispersão unidimensional do escore dos linfócitos.

As figuras 11 a 14 demonstram as alterações histológicas cardíacas encontradas entre os grupos estudados.

Figura 11 – Aspecto microscópico de fragmento cardíaco de rato após PA (grupo 12h). Presença de fibras cardíacas apresentando degeneração vacuolar difusa (HE – 400x).

Figura 12 – Aspecto microscópico de fragmento cardíaco de rato após PA (grupo 12h). Presença de linfócitos ao redor de fibras cardíacas necróticas – *spot* necrose (HE – 400x).

Figura 13 – Aspecto microscópico de fragmento cardíaco de rato após PA (grupo 24h). Presença de linfócitos permeando as fibras cardíacas necróticas (HE – 400x).

Figura 14 – Aspecto microscópico de fragmento cardíaco de rato após PA (grupo 12h). Presença de hemorragia entre as fibras miocárdicas (HE – 400x).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com a intenção de se avaliar as alterações do miocárdio frente à situação de PAG experimental.

O modelo experimental escolhido foi a injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio a 4% no ducto biliopancreático de ratos (figura 3), inicialmente descrito por Storck (46) e adaptado para nosso meio por Abdo et al. (55). Este modelo apresenta grande importância na compreensão da fisiopatologia e modulação do processo inflamatório resultante da PAG (56-58).

No presente estudo, comprovamos a PA nos animais submetidos a injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio pela elevação da amilase no grupo 2h (gráfico 14) e a gravidade da PA demonstrada no estudo histológico, onde observamos acentuado edema pancreático, necrose acinar, infiltrado inflamatório e necrose gordurosa (gráficos 21 a 25).

Além da histologia, outros métodos podem ser utilizados para o estudo da intensidade da lesão pancreática, como a determinação dos níveis de peptídeos liberados na ativação do tripsinogênio (TAP), produção de citocinas inflamatórias e lesão mitocondrial hepática (58-60).

Optamos pela determinação dos níveis de citocinas circulantes, visto que desempenham um importante papel não só na resposta inflamatória local como também sistêmica. Níveis séricos elevados de IL-6 em pacientes com PAG são correlacionados com pior escore de gravidade (Ranson e APACHE II) e longa permanência na unidade de terapia intensiva (UTI) (61). Outras citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α , primariamente induzidas pela IL-6 e IL-8, são

responsáveis pelo colapso circulatório encontrado na sepse grave e, sua presença em níveis elevados também determina um pior prognóstico (62).

No presente estudo encontramos níveis séricos elevados de IL-6, IL-10 e TNF- α após 2h da indução da PA e ausência no grupo 24h (gráficos 14 a 17). As diferenças nos padrões de resposta do TNF- α e IL-6 após estímulo fisiológico agudo podem ser relacionadas aos diferentes tempos de liberação e regulação cruzada destas citocinas. Especificamente, TNF- α geralmente aparece no início, seguido pela secreção de IL-6 e esta provoca efeito supressor sobre a expressão do TNF- α (63). Neste contexto, após 12h da PA observamos aumento dos níveis séricos de IL-6 (gráfico 16) e queda de TNF- α (gráfico 15).

Os níveis séricos de IL-10, citocina antinflamatória, mantêm relação paralela com os níveis séricos de TNF- α e IL-6 como já observado em estudo anterior (12). Entretanto, os trabalhos publicados apresentam associação variável com lesão tissular e gravidade da PA (13), se por um lado Chen et al. (64) demonstraram que pode ser utilizado como preditor de gravidade, por outro estudo, Dumont et al. (65) apresentaram resultados conflitantes.

Em muitos pacientes com PA grave, a SIRS pode progredir para IMO, caracterizando um sinal de pior prognóstico, necessitando de cuidados intensivos redobrados por aumentar a mortalidade em quatro vezes (66).

Alterações hemodinâmicas relacionadas com PA podem ocorrer em PAG, mesmo sem sepse documentada. Di Carlo et al. (67), em estudo de 21 pacientes com PAG, observaram taquicardia e índice cardíaco semelhante ao encontrado no choque séptico. Foi observada redução do tônus vascular e depressão da função ventricular do miocárdio no momento do diagnóstico em 40% dos pacientes. Além

disso, pacientes com PAG apresentaram depressão miocárdica devido à redução do débito ventricular esquerdo similar aos encontrados em outros pacientes sépticos (7, 68).

Poucos relatos têm documentado anormalidades na contratilidade cardíaca pela PAG, quando estas ocorrem tendem a se normalizar assim que o paciente se recupera (69,70).

A ecocardiografia é o método de escolha na avaliação não invasiva do coração na prática clínica, pois permite o estudo anatômico e funcional do órgão em diversas patologias cardíacas devido à acessibilidade, praticidade e fácil interpretação (71). Em estudo clínico onde foram pesquisadas alterações cardíacas em vigência de PA encontrou-se alterações ecocardiográficas em mais de 50% dos pacientes (72). Neste mesmo estudo, o derrame pericárdico e a disfunção diastólica foram associados com aumento da mortalidade, além de precipitarem insuficiência cardíaca na vigência de ressuscitação venosa agressiva.

A imagem ultra-sonográfica não invasiva representa não somente um refinamento tecnológico, mas também um avanço na capacidade de avaliar e quantificar a estrutura e função de órgãos em estudos experimentais, substituindo outras técnicas que causavam dor e estresse aos animais (73,74).

Nos últimos anos, inúmeras publicações têm demonstrado o valor da ecocardiografia transtorácica para avaliar a morfologia e função do ventrículo esquerdo, determinar o débito cardíaco ou a massa ventricular que era realizada mediante eutanásia e retirada dos corações dos animais (75-79). Assim, esta técnica pode ser realizada repetidas vezes no mesmo animal, reduzindo o número de animais utilizados.

Ao analisarmos os achados ecocardiográficos do presente estudo, podemos observar a possibilidade de comparação dos resultados obtidos, uma vez que a frequência cardíaca (FC) entre os grupos foi semelhante (gráfico 1).

A espessura da parede miocárdica, o septo interventricular (SIV) e a parede posterior (PP), não apresentaram alterações significativas, sugerindo a ausência de hipertrofia e/ou isquemia miocárdicas (gráficos 4 e 5), embora circulação de altas concentrações de IL-6 foi associada com risco aumentado de eventos de doença coronariana em estudos prospectivos observacionais (80–82).

A fração de encurtamento (FS) e a fração de ejeção (FE) não sofreram alterações significativas demonstrando a estabilidade da função sistólica miocárdica (gráficos 6 e 7). O fato de que a FS esteja normal não quer dizer, necessariamente, que a contratilidade miocárdica não sofreu alterações, mesmo porque não efetuamos medidas invasivas da mesma.

Da mesma maneira, a preservação da função diastólica traduzida pelas variáveis, tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e relação entre as velocidades diastólicas precoce e tardia (E/A), permaneceu sem alterações significativas entre os grupos (gráficos 9 a 11). O índice de desempenho miocárdico (IDM) não apresentou alteração ao longo do tempo, demonstrando a preservação da função global do miocárdio (gráfico 12).

Por outro lado, encontramos diminuição dos diâmetros diastólicos (DD) e sistólicos (DS) do ventrículo esquerdo (VE) que podem estar relacionados à hipovolemia secundária ao intenso processo inflamatório provocado pela PAG (gráficos 2 e 3).

Segundo Flierl et al. (83), a disfunção cardíaca, complicação bem reconhecida da sepse grave, é caracterizada por dilatação ventricular, redução na fração de ejeção e contratilidade reduzida. Embora as alterações cardíacas na PAG e na sepse possam relacionar-se, no presente estudo as mensurações ecocardiográficas foram marcadamente alteradas no grupo 2h e, neste tempo, não há sepse.

Fatores circulantes do sangue estão envolvidos na evolução das alterações miocárdicas induzida por choque séptico, e os eventos celulares e moleculares do próprio tecido miocárdico são alvos de pesquisadores em busca do melhor entendimento deste processo (84). No modelo experimental utilizado houve aumento significativo dos níveis séricos de interleucinas no grupo 2h (gráficos 14 a 17), e por consequência o miocárdio também pode por si só responder aumentando ou diminuindo níveis de RNAm dos fatores inflamatórios.

As análises dos níveis de RNAm e a proteína por ele transcrita são complementares e ambas são necessárias para uma compreensão completa da forma como a célula funciona (85). Desta maneira, como o RNAm é traduzido em proteína, pode-se supor que deve haver correlação entre o nível de RNAm e de proteína. Entretanto, nem sempre isso acontece porque os diferentes momentos entre a transcrição e tradução protéica permitem que outros fatores interfiram no resultado encontrado (86,87).

Flores-Arredondo et al. (43) estudaram modelo experimental de infarto do miocárdio em camundongos induzindo hipertensão e disfunção cardíaca e encontraram incremento na produção intra-cardíaca de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, ocorreu um decréscimo da expressão de citocinas anti-inflamatórias, em

particular a IL-10. Estes achados foram associados com aumento da hipertrofia e fibrose e diminuição da fração de ejeção ventricular.

Em outro estudo experimental de diabetes em camundongos realizado por Zhang et al. (44), foram estudados os efeitos inflamatórios e danos cardíacos provocados por baixas doses de radiação. O aumento de expressão do TNF- α no miocárdio foi associado à indução de morte celular cardíaca por meio do estresse oxidativo.

Plenz et al. (88) estudaram corações de doentes com insuficiência cardíaca avançada no momento do explante do órgão para transplante e encontraram a expressão de IL-6 e do seu receptor no tecido do miocárdio significativamente maior do que a encontrada em amostras de biópsias de indivíduos sem doença estrutural, submetidos a estudo eletrofisiológico. Este mecanismo poderia explicar a estreita correlação entre os elevados níveis séricos de IL-6 e a disfunção cardíaca aguda do enxerto no início do período perioperatório, podendo desempenhar um importante papel na fisiopatologia da insuficiência cardíaca avançada (43).

A expressão gênica de IL-6 aparece exarcebada no grupo PA 2 horas em relação aos demais (gráfico 18). Aparentemente o tecido cardíaco tem como primeira reação, na vigência de PAG, a produção endógena de IL-6 que pode relacionar-se com as alterações funcionais e não histológicas (tabela 5), como descrito por Plentz et al. (88).

Posteriormente, encontramos maior expressão de TNF- α nos grupos 24h e 15 dias em relação aos grupos controle operado e 2h (gráfico 20). O aparecimento tardio do TNF- α pode estar relacionado com as alterações histológicas encontradas

e associadas com morte celular cardíaca (tabela 5) e também correlacionados no estudo anterior de Zhang et al. (44).

Aumento da expressão de TGF- β foi encontrado em modelo experimental de hipertrofia cardíaca em ratos Wistar com constrição aórtica suprarrenal (89). O TGF- β é detectado no interstício, principalmente em lugares onde fibroblastos demonstram atividade proliferativa e estão associados à indução de colágeno tipo I e III, e fibrose miocárdica.

O resultado da expressão gênica do TGF- β , em nosso estudo, demonstra um aparecimento tardio (PA 12 horas) podendo estar relacionado com alterações reparadoras cardíacas após estímulo inflamatório (gráfico 19).

Estudos experimentais demonstram estreita correlação entre alterações estruturais miocárdicas e resposta inflamatória sistêmica grave (90,91), tais como edema intersticial e mitocondrial e necrose miocárdica. Por outro lado, também foi encontrada uma diminuição da contratilidade do miocárdio em vigência de sepse, mesmo na ausência de lesão tecidual (92).

Rossi et al. (93), em estudo para avaliar se as alterações estruturais cardíacas induzidas por sepse podem provocar disfunção cardíaca, analisaram corações de humanos em autópsias após prolongado estado de choque séptico grave, incluindo PA. Foram encontrados aumento de expressão de TNF- α e alterações miocárdicas inespecíficas, tais como cardiomiócitos levemente hipertrofiados, leve a moderado edema intersticial, discreta fibrose intersticial e aumento de macrófagos (94). Em conclusão, o elevado número de macrófagos em associação com expressão de TNF- α pode favorecer a redução da função cardíaca em corações sépticos.

É interessante que os cardiomiócitos são capazes de gerar TNF- α , IL-1 β e IL-6, durante a sepse. Este é um fenômeno aparentemente paradoxal, porque tais produtos provenientes dos cardiomiócitos irão prejudicar o seu próprio desempenho durante uma resposta inflamatória sistêmica (83, 95).

Kuwahara et al. (96), estudando as alterações histológicas cardíacas provocadas pela expressão de TGF- β em ratos Wistar hipertensos, encontrou que a ativação de fibroblastos e indução de TGF- β ocorreu antes que significativa fibrose miocárdica tivesse se desenvolvido e, além disso, o aumento da expressão de TGF- β foi mantida durante a progressão da fibrose miocárdica. Em conclusão, o TGF- β desempenha um papel chave na fibrose miocárdica em corações hipertensos de ratos, através da ativação de fibroblastos. Estes achados também foram exemplificados em outros estudos (88, 97).

É possível que as alterações na análise da expressão dos níveis de RNAm do miocárdio no modelo experimental seja o início de um processo cicatricial em longo prazo. Novos estudos serão necessários para a comprovação desta hipótese.

No estudo histológico do coração encontramos alterações significativas na degeneração vacuolar, picnose e perda de núcleos e linfócitos, o que pode estar relacionado com os fenômenos inflamatórios desencadeados pela PAG (gráficos 26 a 31). Estas alterações se mantêm nos estudos histológicos de 15 dias e parecem estar relacionadas com o aumento da expressão de TNF- α .

No presente estudo pudemos comprovar que no modelo experimental utilizado, o tecido miocárdico produziu citocinas localmente, sendo que a produção de IL-6 foi precoce e correlacionou-se com o mesmo período em que encontramos alterações ecocardiográficas no ventrículo esquerdo. A produção de TNF- α ocorreu

no mesmo período dos achados histológicos compatíveis com morte celular e TGF- β em período posterior.

Em resumo, apesar da identificação de vários mecanismos que contribuem na disfunção cardíaca durante a PAG, estamos longe de compreender a sua exata dimensão e impacto precoce e tardio na evolução destes doentes.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo, realizado nas condições descritas acima, permitiu concluir que na pancreatite aguda grave:

1. Ocorrem alterações funcionais cardíacas compatíveis com o processo inflamatório desencadeado pela PA;
2. Há expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) pelo tecido cardíaco e, mais tardiamente de TGF- β ;
3. As alterações histológicas encontradas no miocárdio ocorreram tardiamente e estão relacionadas com a expressão de RNAm das citocinas.

ANEXO 1: Medidas-resumo das informações coletadas no ecocardiograma dos animais, segundo grupo.

	controle (n=6)				controle op (n=6)				PA 2 horas (n=6)				PA 12 horas (n=6)				PA 24 horas (n=6)				PA 15 dias (n=6)				
	med ^a	min ^b	max ^c	dp ^d	med ^a	min ^b	max ^c	dp ^d	med ^a	min ^b	max ^c	dp ^d	med ^a	min ^b	max ^c	dp ^d	med ^a	min ^b	max ^c	dp ^d	med ^a	min ^b	max ^c	dp ^d	p
FC (bpm)	245,2	170,0	335,0	79,8	230,5	182,0	284,0	47,7	225,8	176,0	317,0	66,7	241,8	174,0	317,0	68,9	237,3	176,0	322,0	68,9	215,2	180,0	327,0	56,3	0,971 ^e
DD (mm)	6,8	5,9	7,2	0,5	7,7	6,7	8,6	0,7	4,9	3,4	6,1	1,0	6,0	4,5	7,7	1,4	7,1	6,4	7,8	0,6	7,4	6,8	8,1	0,5	<0,001 ^e
DS (mm)	4,0	3,0	4,5	0,6	4,8	3,6	6,7	1,4	2,9	2,1	3,3	0,5	3,3	1,7	4,4	1,0	4,1	3,2	4,9	0,6	4,3	3,5	4,9	0,5	0,012 ^e
SIV (mm)	1,0	0,7	1,3	0,2	1,0	0,8	1,2	0,2	1,1	0,8	1,6	0,3	1,0	0,8	1,3	0,2	1,1	0,9	1,3	0,2	1,0	1,0	1,1	0,0	0,542 ^e
PP (mm)	1,0	0,8	1,5	0,3	1,3	0,9	1,7	0,3	1,2	0,7	1,7	0,4	1,1	0,8	1,5	0,3	1,3	1,1	1,6	0,2	1,2	1,1	1,4	0,1	0,496 ^e
FS (%)	41,5	35,6	53,1	6,7	38,0	22,0	47,3	12,4	40,4	29,6	46,4	6,5	45,3	27,5	63,8	11,7	42,2	34,7	51,5	5,9	41,7	33,8	50,0	6,0	0,810 ^e
FE (%)	79,3	73,3	89,7	6,2	73,7	52,5	85,4	16,4	78,2	65,0	84,6	7,5	81,8	61,8	95,3	11,0	80,2	72,1	88,6	5,8	79,6	71,0	87,5	6,2	0,778 ^e
AE (mm)	4,1	2,5	5,4	1,0	4,0	2,8	5,2	0,9	3,1	2,5	3,5	0,4	3,6	2,1	5,8	1,4	4,5	3,4	5,9	0,9	4,6	3,8	5,4	0,6	0,069 ^e
TRIV (mseg)	41,5	25,0	72,0	17,0	31,5	15,0	50,0	11,3	39,7	25,0	58,0	10,7	32,3	31,0	33,0	1,0	27,0	17,0	36,0	6,7	35,2	25,0	50,0	8,5	0,186 ^e
TRIV corrigido	7,9	5,9	12,2	2,3	6,3	2,6	10,2	2,6	7,7	4,3	10,2	2,3	6,4	5,3	7,6	1,0	5,2	3,9	6,3	0,9	6,8	4,3	11,7	2,6	0,248 ^e
E/A	1,5	1,4	1,6	0,1	2,1	1,2	4,3	1,2	1,7	1,3	2,2	0,3	1,5	1,2	1,9	0,3	1,5	1,0	2,4	0,5	1,5	0,0	2,4	0,8	0,574 ^e
IDM	0,5	0,2	0,8	0,2	0,6	0,4	0,8	0,2	0,9	0,4	1,1	0,3	1,0	0,4	1,5	0,5	0,8	0,4	1,2	0,4	0,7	0,2	1,6	0,5	0,251 ^e
FS/IDM	95,8	49,8	222,5	63,6	68,5	28,7	120,3	33,2	47,9	38,4	68,7	11,9	62,7	30,3	165,5	52,1	65,1	31,0	113,8	33,5	90,8	30,9	224,9	70,7	0,532 ^e

^amédia aritmética, ^bvalor mínimo, ^cvalor máximo, ^ddesvio-padrão^eANOVA

FC = frequência cardíaca; DD = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DS = diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; SIV = septo interventricular; PP = espessura relativa da parede posterior do ventrículo esquerdo; FS = fração de encurtamento; FE = fração de ejeção; AE = diâmetro sistólico do átrio esquerdo; TRIV = tempo de relaxamento isovolumétrico; E/A = relação entre as velocidades diastólicas regionais; IDM = índice de desempenho do miocárdio.

Anexo2: Medidas-resumo séricas da amilase (U/mL), TNF- α (pg/mL), IL-6 (pg/mL) e IL-10 (pg/mL).

	amilase (U/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
controle (n=6)				
média	7,4	0,0	0,0	0,0
mediana	7,4	0,0	0,0	0,0
mínimo	6,2	0,0	0,0	0,0
máximo	8,5	0,0	0,0	0,0
desvio-padrão	1,1	0,0	0,0	0,0
controle op (n=6)				
média	8,7	0,0	0,0	0,0
mediana	8,7	0,0	0,0	0,0
mínimo	6,4	0,0	0,0	0,0
máximo	11,3	0,0	0,0	0,0
desvio-padrão	1,8	0,0	0,0	0,0
PA 2 horas (n=6)				
média	13,1	58,5	110,0	83,8
mediana	12,9	58,5	114,0	77,0
mínimo	11,4	14,0	61,0	47,0
máximo	15,3	97,0	156,0	153,0
desvio-padrão	1,3	35,5	38,8	38,6
PA 12 horas (n=6)				
média	10,3	0,0	171,2	40,0
mediana	9,7	0,0	134,5	44,0
mínimo	7,0	0,0	33,0	0,0
máximo	14,3	0,0	370,0	67,0
desvio-padrão	2,8	0,0	134,0	22,1
PA 24 horas (n=6)				
média	8,4	0,0	0,0	0,0
mediana	7,7	0,0	0,0	0,0
mínimo	5,2	0,0	0,0	0,0
máximo	12,3	0,0	0,0	0,0
desvio-padrão	2,8	0,0	0,0	0,0
PA 15 dias (n=6)				
média	7,5	0,0	0,0	0,0
mediana	7,7	0,0	0,0	0,0
mínimo	6,2	0,0	0,0	0,0
máximo	8,0	0,0	0,0	0,0
desvio-padrão	0,7	0,0	0,0	0,0
p	0,001 ^e	<0,001 ^f	<0,001 ^f	<0,001 ^f

^eANOVA, ^fKruskal-Wallis

Anexo 3: Medidas-resumo da expressão gênica de RNAm IL-6 (unidade arbitrária), TGF- β (unidade arbitrária) e TNF- α (unidade arbitrária).

	IL-6 (unidade arbitrária)	TGF- β (unidade arbitrária)	TNF- α (unidade arbitrária)
controle (n=6)			
média	1,5	1,0	0,7
mediana	1,4	1,0	0,7
mínimo	0,6	0,8	0,5
máximo	2,6	1,4	0,9
desvio-padrão	0,8	0,2	0,2
controle op (n=6)			
média	0,8	0,4	0,3
mediana	0,6	0,3	0,3
mínimo	0,2	0,1	0,1
máximo	1,8	1,0	0,5
desvio-padrão	0,6	0,3	0,2
PA 2 horas (n=6)			
média	6,2	0,9	0,3
mediana	5,1	0,9	0,2
mínimo	1,3	0,7	0,2
máximo	12,6	1,1	0,4
desvio-padrão	4,5	0,2	0,1
PA 12 horas (n=6)			
média	0,6	1,8	0,7
mediana	0,5	1,8	0,8
mínimo	0,2	0,9	0,4
máximo	1,6	2,8	1,0
desvio-padrão	0,5	0,7	0,2
PA 24 horas (n=6)			
média	1,8	0,9	1,0
mediana	1,7	0,9	1,1
mínimo	0,5	0,4	0,7
máximo	3,8	1,5	1,5
desvio-padrão	1,2	0,4	0,3
PA 15 dias (n=6)			
média	1,3	0,9	1,0
mediana	1,2	0,9	0,9
mínimo	0,6	0,7	0,6
máximo	2,4	1,3	1,7
desvio-padrão	0,7	0,2	0,4
p	<0,001 ^e	<0,001 ^e	<0,001 ^e

^eANOVA

Anexo 4: Distribuição dos escores do edema, necrose acinar, infiltrado inflamatório, hemorragia e necrose gordurosa do pâncreas.

	controle (n=6)		controle op (n=6)		PA 2 horas (n=6)		PA 12 horas (n=6)		PA 24 horas (n=6)		PA 15 dias (n=6)		p
edema	0	6 100,0%	6	100,0%	-	-	-	-	-	-	4	66,7%	<0,001 ^f
	0,5	-	-	-	4	66,7%	2	33,3%	-	-	2	33,3%	
	1	-	-	-	1	16,7%	-	-	-	-	-	-	
	1,5	-	-	-	1	16,7%	2	33,3%	1	16,7%	-	-	
	2	-	-	-	-	-	2	33,3%	5	83,3%	-	-	
necrose acinar	0	6 100,0%	6	100,0%	-	-	-	-	-	-	6	100,0%	<0,001 ^f
	0,5	-	-	-	2	33,3%	-	-	-	-	-	-	
	1,5	-	-	-	2	33,3%	2	33,3%	-	-	-	-	
	2,5	-	-	-	1	16,7%	2	33,3%	-	-	-	-	
	3	-	-	-	1	16,7%	-	-	1	16,7%	-	-	
	3,5	-	-	-	-	-	2	33,3%	5	83,3%	-	-	
infiltrado inflamatório	0	6 100,0%	6	100,0%	-	-	-	-	-	-	5	83,3%	<0,001 ^f
	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16,7%	
	1	-	-	-	6	100,0%	2	33,3%	-	-	-	-	
	1,5	-	-	-	-	-	1	16,7%	-	-	-	-	
	2,5	-	-	-	-	-	-	-	2	33,3%	-	-	
	3	-	-	-	-	-	1	16,7%	-	-	-	-	
	3,5	-	-	-	-	-	2	33,3%	4	66,7%	-	-	
hemorragia	0	6 100,0%	6	100,0%	6	100,0%	-	-	6	100,0%	6	100,0%	<0,001 ^f
	0,5	-	-	-	-	-	6	100,0%	-	-	-	-	
necrose gordurosa	0	6 100,0%	6	100,0%	3	50,0%	-	-	-	-	4	66,7%	<0,001 ^f
	0,5	-	-	-	1	16,7%	-	-	-	-	2	33,3%	
	1	-	-	-	2	33,3%	-	-	1	16,7%	-	-	
	1,5	-	-	-	-	-	3	50,0%	1	16,7%	-	-	
	2	-	-	-	-	-	3	50,0%	2	33,3%	-	-	
	2,5	-	-	-	-	-	-	-	2	33,3%	-	-	

^fKruskal-Wallis

Anexo 5: Distribuição dos escores da degeneração vacuolar, necrose de coagulação, edema, picnose e perda de núcleos, spot necrose e linfócitos do coração.

	controle (n=6)			controle op (n=6)		PA 2 horas (n=6)		PA 12 horas (n=6)		PA 24 horas (n=6)		PA 15 dias (n=6)		p
degeneração vacuolar	0	6	100,0%	5	83,3%	4	66,7%	3	50,0%	3	50,0%	1	16,7%	0,048 ^f
	1	-	-	1	16,7%	2	33,3%	3	50,0%	3	50,0%	4	66,7%	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16,7%	
necrose de coagulação	0	6	100,0%	6	100,0%	3	50,0%	5	83,3%	5	83,3%	6	100,0%	0,099 ^f
	1	-	-	-	-	3	50,0%	1	16,7%	1	16,7%	-	-	
edema	0	5	83,3%	5	83,3%	2	33,3%	3	50,0%	4	66,7%	5	83,3%	0,207 ^f
	1	1	16,7%	1	16,7%	2	33,3%	2	33,3%	2	33,3%	1	16,7%	
	2	-	-	-	-	2	33,3%	1	16,7%	-	-	-	-	
picnose e perda de núcleos	0	6	100,0%	6	100,0%	3	50,0%	5	83,3%	6	100,0%	6	100,0%	0,034 ^f
	1	-	-	-	-	3	50,0%	1	16,7%	-	-	-	-	
spot necrose	0	6	100,0%	6	100,0%	5	83,3%	6	100,0%	6	100,0%	4	66,7%	0,191 ^f
	1	-	-	-	-	1	16,7%	-	-	-	-	2	33,3%	
linfócitos	0	6	100,0%	6	100,0%	1	16,7%	-	-	3	50,0%	3	50,0%	0,001 ^f
	1	-	-	-	-	5	83,3%	6	100,0%	3	50,0%	3	50,0%	

^fKruskal-Wallis

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banks PA. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc.* 2002;56:S226-30.
2. De Campos T, Parreira JG, Utiyama E, Rasslan S. Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(5):304-10.
3. Yamanari MGI, Kunitake TA, Almeida JLJ, Jukemura J, Cunha JEM, Machado MCC. Efeito da hipertermia na pancreatite aguda experimental. *Rev Col Bras Cir.* 2007;34:35-40.
4. Talukdar R, Vege SS. Recent developments in acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(11 Suppl):S3-9.
5. Talukdar R, Swaroop Vege S. Early management of severe acute pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2011;13(2):123-30.
6. Wu BU. Prognosis in acute pancreatitis. *CMAJ.* 2011;183(6):673-7.
7. Bradley EL 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, GA, September 11-13, 1992. *Arch Surg.* 1993;128(5):586-90.
8. UK Working Party on Acute Pancreatitis. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. *Gut.* 2005;54(Suppl III):III1-9.
9. Bollen TL, Besselink MGH, van Santvoort HC, Gooszen HG, van Leeuwen MS. Toward an update of the Atlanta classification on acute pancreatitis: review of new and abandoned terms. *Pancreas.* 2007;35(2):107-13.
10. Bollen TL, van Santvoort HC, Besselink MG, van Leeuwen MS, Horvath KD, Freeny PC, Gooszen HG, Dutch Acute Pancreatitis Study Group. The Atlanta classification of acute pancreatitis revisited. *Br J Surg.* 2008;95(2):6-21.

11. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62(1):102-11.
12. Talukdar R, Clemens M, Vege SS. Moderately severe acute pancreatitis: prospective validation of this new subgroup of acute pancreatitis. *Pancreas*. 2012;41(2):306-9.
13. Vege SS, Gardner TB, Chari ST, Munukuti P, Pearson RK, Clain JE, Petersen BT, Baron TH, Farnell MB, Sarr MG. Low mortality and high morbidity in severe acute pancreatitis without organ failure: a case for revising the Atlanta classification to include "Moderately severe acute pancreatitis". *Am J Gastroenterol*. 2009;104:710-15.
14. Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2009;15:1427-30.
15. 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 São Paulo*. 1985;40(3):120-4.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut*. 2000;47:546-52.

20. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9:401-10.
21. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*. 1998;175(1):76-83.
22. 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*. 2002;21(2):141-6.
23. Dugernier TL, Laterre PF, Wittebole X, Roeseler J, Latinne D, Reynaert MS, Pugin J. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:148-57.
24. 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.
25. Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Degraef C, Delhay M, Geerts A, Deviere J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:1105-12.
26. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg*. 1997;21:130-5.
27. Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HG. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Pancreatology*. 2001;1(1):63-8.
28. Brown GW, Pitchumoni CS. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12:7087-96.
29. Alves Júnior A, Sampietre SN, de Mendonça Coelho AM, Kubrusly MS, Molan NAT, Machado MCC, Pinotti HW. Lung lesion in acute pancreatitis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1995;50:305-10.
30. de Campos T, Deree J, Martins JO, Loomis WH, Shenvi E, Putnam JG, Coimbra R. Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and

neutrophil activation in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2008;37(1):42-9.

31. Eşrefoğlu M, Gül M, Turan F. Comparative effects of several therapeutic agents on hepatic damage induced by acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2008;53(5):1303-10.
32. Batcioglu K, Gul M, Uyumlu AB, Esrefoglu M. Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein-induced acute pancreatitis. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(9):776-82.
33. Papachristou GI, Clermont G, Sharma A, Yadav D, Whitcomb DC. Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007;36(2):277-96.
34. Pitchumoni CS, Agarwal N, Jain NK. Systemic complications of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 1988;83(6):597-606.
35. Greer SE, Burchard K W. Acute pancreatitis and critical illness: a pancreatic tale of hypoperfusion and inflammation. *Chest*. 2009;136(5):1413-9.
36. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(3):95-109.
37. Kanaian AS, Permiakov NK, Khandanian RK, Gevorkian GA. Combined pathology of the pancreas and myocardium in myocardial infarction and acute destructive pancreatitis. *Arkh Patol*. 1996;58(5):56-61.
38. Saulea A, Costin S, Rotari V. Heart ultrastructure in experimental acute pancreatitis. *Rom J Physiol*. 1997;34(1-4):35-44.
39. Meador BM, Krzyszton CP, Johnson RW, Huey KA. Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1 β , and TNF- α responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult. *J Appl Physiol*. 2008;104:991-7.
40. Yun Y, Hou L, Sang N. SO(2) inhalation modulates the expression of pro-inflammatory and pro-apoptotic genes in rat heart and lung. *J Hazard Mater*. 2011;185(1):482-8.
41. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of

recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101(18):2149-53.

42. Reil JC, Gilles S, Zahler S, Brandl A, Drexler H, Hültner L, Matrisian LM, Welsch U, Becker BF. Insights from knock-out models concerning postischemic release of TNF alpha from isolated mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(1):133-41.
43. Flores-Arredondo JH, García-Rivas G, Torre-Amione G. Immune modulation in heart failure: past challenges and future hopes. *Curr Heart Fail Rep*. 2011;8:28-37.
44. Zhang C, Jin S, Guo W, Li C, Li X, Rane MJ, Wang G, Cai L. Attenuation of diabetes-induced cardiac inflammation and pathological remodeling by low-dose radiation. *Radiat Res*. 2011;175(3):307-21.
45. Lankisch PG, Koop H, Winckler K, Fölsch UR, Creutzfeldt W. Somatostatin therapy of acute experimental pancreatitis. *Gut*. 1977;18(9):713-6.
46. Storck G. Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical studies in the rat. *Acta Chir Scand*. 1971;417:1-36.
47. Salemi VM, Pires MD, Cestari IN, Cestari IA, Picard MH, Leirner AA, MadyC. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artif Organs*. 2004;28:332-7.
48. Jamieson AD, Pruitt KM, Calwell RC. An improved amylase assay. *J Dental Res*. 1969;48:483.
49. Rozen S and Skaletsky HJ. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press;2000. P.365-86.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*. 2001; 25:402-8.
51. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, A better model of acute pancreatitis of evaluating therapy. *Ann Surg*. 1992; 215:44-56.

52. Kirkwood B R, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts, USA: Blackwell Science; 2006. P.502.
53. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996. P.1408.
54. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat.* 1964;35:716-25.
55. Abdo EE, Gonçalves Y, Machado MC, Aguirre-Costa PL, Gonçalves F, Sampietri SN, Pinotti HW. Mononuclear phagocytic system in acute pancreatitis. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26(3):285-90.
56. Perides G, van Acker GJ, Laukkanen JM, Steer ML. Experimental acute biliary pancreatitis induced by retrograde infusion of bile acids into the mouse pancreatic duct. *Nat Protoc.* 2010;5(2):335-41.
57. Hegyi P, Pandol S, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2011;60(4):544-52.
58. 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.
59. Fernández-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.
60. Schmidt J, Fernández-del Castillo C, Rattner 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.
61. Abe R, Oda S, Shinozaki K, et al. Continuous hemodiafiltration using a polymethyl methacrylate membrane hemofilter for severe acute pancreatitis. *Contrib Nephrol.* 2010;166:54-63.
62. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers and mediators. *Shock.* 2005;24:45-51.

63. Steptoe A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2007;21(7):901-12.
64. Chen CC, Wang SS, Lu RH, Chang FY, Lee SD. Serum interleukin 10 and interleukin 11 in patients with acute pancreatitis. *Gut*. 1999;45(6):895-9.
65. Dumot JA, Conwell DL, Zuccaro G Jr, Vargo JJ, Shay SS, Easley KA, Ponsky JL. A randomized, double blind study of interleukin 10 for the prevention of ERCP-induced pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(7):2098-102.
66. Bhatia M, Wong FL, Cao Y et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2005; 5:132-44.
67. Di Carlo V, Nespoli A, Chiesa R, Staudacher C, Cristallo M, Bevilacqua G, Staudacher V. Hemodynamic and metabolic impairment in acute pancreatitis. *World J Surg*. 1981;5(3):329-39.
68. Ito K, Ramirez-Schon G, Shah PM, Agarwal N, Delguercio LR, Reynolds BM. Myocardial function in acute pancreatitis. *Ann Surg*. 1981;194:85-8.
69. Ro TK, Lang RM, Ward RP. Acute pancreatitis mimicking myocardial infarction: evaluation with myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:387-90.
70. Patel J, Movahed A, Reeves WC. Electrocardiographic and segmental wall motion abnormalities in pancreatitis mimicking myocardial infarction. *Clin Cardiol*. 1994;17:505-9.
71. Campos FO, Zielinsky P, Ortiz J, Maciel BC, Andrade JL, Mathias W, Brindeiro DF, Assef JE, Lima CTO, Barbosa MM, Moisés VA, Borges SM, Pontes SC, Tasca R, Gimenez VM, Castro I, Gil MA, Arruda-Olson A, Tsu-Tsui JM, Guimarães JI. Diretriz para indicações e utilização da ecocardiografia na prática clínica. *Arq Bras Cardiol*. 2004;82(2):11-34.
72. Nadkarni N, Bhasin DK, Rana SS, Bahl A, Sinha SK, Rao C, Talwar KK. Diastolic dysfunction, prolonged QTc interval and pericardial

effusion as predictors of mortality in acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(10):1576-80.

73. Burrell LM, Chan R, Phillips PA, Calafiore P, Tonkin AM, Johnston CI. Validation of an echocardiographic assessment of cardiac function following moderate size myocardial infarction in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23(6-7):570-2.
74. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000;89(4):1445-54.
75. Legrice IJ, Pope AJ, Sands GB, Whalley G, Doughty RN, Smaill BH. Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(11):H1353-65.
76. Liao SS, Ruan QY, Lin MY, Yan L. Value of segmental myocardial strain by 2-dimensional strain echocardiography for assessment of scar area induced in a rat model of myocardial infarction. *Cardiovasc Ultrasound*. 2012;10:17.
77. Kim KH, Kim YJ, Lee SP, Kim HK, Seo JW, Sohn DW, Oh BH, Park YB. Survival, exercise capacity, and left ventricular remodeling in a rat model of chronic mitral regurgitation: serial echocardiography and pressure-volume analysis. *Korean Circ J*. 2011;41(10):603-11.
78. Strunz CM, Matsuda M, Salemi VM, Nogueira A, Mansur AP, Cestari IN, Marquezini MV. Changes in cardiac heparan sulfate proteoglycan expression and streptozotocin-induced diastolic dysfunction in rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:35.
79. Vanzelli AS, Medeiros A, Sirvente Rde A, Salemi VM, Mady C, Brum PC. Association of physical training with beta-blockers in heart failure in mice. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(3):373-80.
80. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767-72.

81. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med.* 2008;5:e78.
82. Sattar N, Murray HM, Welsh P, et al. Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular events? *PLoS Med.* 2009; 6: e1000099.
83. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med.* 2008;14(5-6):327-36.
84. Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev.* 2010;15(6):605-11.
85. Hatzimanikatis V, Choe LH, Lee KH. Proteomics: theoretical and experimental considerations. *Biotechnol Prog.* 1999;15:312-8.
86. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999;286:531-7.
87. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem.* 2002;48:1170-7.
88. Plenz G, Eschert H, Erren M, Wichter T, Böhm M, Flesch M, Scheld HH, Deng MC. The interleukin-6/interleukin-6-receptor system is activated in donor hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(9):1508-12.
89. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertens Res.* 2005;28(6):483-90.
90. Gotloib L, Shostak A, Galdi P, Jaichenko J, Fudin R. Loss of microvascular negative charges accompanied by interstitial edema in septic rats' heart. *Circ Shock.* 1992;36(1):45-56.
91. Solomon MA, Correa R, Alexander HR, Koev LA, Cobb JP, Kim DK, Roberts WC, Quezada ZM, Scholz TD, Cunnion RE, et al. Myocardial

energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am J Physiol.* 1994;266(2):757-68.

92. Zhou M, Wang P, Chaudry IH. Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis. *Shock.* 1998;9(5):352-8.
93. Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggioro FP. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock.* 2007;27(1):10-8.
94. Azzawi M, Kan SW, Hillier V, Yonan N, Hutchinson IV, Hasleton PS. The distribution of cardiac macrophages in myocardial ischaemia and cardiomyopathy. *Histopathology.* 2005;46(3):314-9.
95. Romero-Bermejo FJ, Ruiz-Bailen M, Gil-Cebrian J, Huertos-Ranchal MJ. Sepsis-induced cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev.* 2011;7(3):163-83.
96. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation.* 2002;106(1):130-5.
97. Takeda N, Manabe I. Cellular interplay between cardiomyocytes and nonmyocytes in cardiac remodeling. *Int J Inflam.* 2011:535241.