EDMOND RAYMOND LE CAMPION

Efeitos da administração endovenosa de pentoxifilina na
isquemia-reperfusão pancreática: estudo experimental
em ratos

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. José Jukemura

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
reprodução autorizada pelo autor

Le Campion, Edmond Raymond

Efeitos da administração endovenosa de pentoxifilina na
isquemia/reperfusão pancreática : estudo experimental em ratos /
Edmond Raymond Le Campion. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: José Jukemura.

Descritores: 1.Pâncreas 2.Isquemia 3.Reperfusão 4.Traumatismo
por reperfusão5.Pentoxifilina 6.Factor de necrose tumoral alfa

Dedicatória

Dedico todo meu esforço empenhado neste trabalho:

A Deus por me capacitar, iluminando minha mente e me dando foco. Sem ele nada disto seria possível.

À minha amada esposa Mayara e querido filho Gabriel, que mesmo nos momentos mais duros de minha profissão me fazem sorrir com seu terno amor, me dando forças para sempre seguir em frente.

À minha doce mãe, pelo total incentivo, sempre me lembrando que as virtudes não se alcançam sem esforço e os defeitos não se corrigem sem luta.

Aos meus queridos irmãos Michel e Alain, por serem um porto seguro nas horas mais difíceis, e pelo grande empenho na minha formação.

Ao meu sogro Michel e minha sogra Graça, por me tratarem como um filho, me dando apoio e exemplo de família em um momento de recomeço de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador Prof. Dr. José Jukemura, exemplo na medicina e criatividade, além da paciência dispensada nestes anos de ensino.

Ao amigo Prof. Dr. Luis Augusto Carneiro D'Albuquerque, meu co-orientador, pelo exemplo de cirurgião e contribuição inquestionável, exercendo papel fundamental na minha formação médica.

Às amigas, Ana Maria Mendonça Coelho, Sandra Nassa Sampietre e Nilza Aparecida Molan, pela grande ajuda técnica e científica, sempre estando presentes para ajudar.

À Dra. Rosely Patzina, que através de seu conhecimento em patologia, nos forneceu informações preciosas em todos os casos estudados.

Aos amigos Prof. Dr. Claudemiro, Dr. Lúcio e Dr. Matheus, cirurgiões do Serviço de Cirurgia de Fígado da Universidade Federal de Goiás, pela amizade e incentivo. Agradeço imensamente, pois sem a cobertura dispensada no serviço, esta tese não seria concluída.

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. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Aspectos éticos	12
3.2 Animais do experimento	12
3.3 Indução da isquemia/reperfusão pancreática	13
3.4 Delineamento experimental	18
3.5 Administração da pentoxifilina e solução salina	20
3.6 Coleta dos materiais para análise	20
3.7 Análise dos materiais coletados.	21
3.7.1 Mediadores inflamatórios	21
3.7.2 Amilase, ureia e creatinina	22
3.7.3 Peroxidação lipídica	22
3.7.4 Atividade da mieloperoxidase pulmonar	23
3.7.5 Análise histológica	23

3.8 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Dosagem de mediadores inflamatórios	28
4.1.1 TNF- α	28
4.1.2 Interleucinas 6 e 10	28
4.1.3 Relação TNF- α /Interleucina 10	30
4.2 Dosagem de amilase	32
4.3 Dosagem de ureia e creatinina	34
4.4 Determinação da peroxidação lipídica	38
4.5 Determinação da mieloperoxidase pulmonar	39
4.6 Avaliação histológica	40
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	51
7 ANEXOS	53
8 REFERÊNCIAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr.	doutor
Et al.	e outros
Prof.	professor

LISTA DE SÍMBOLOS

/	por
°C	grau centígrado
DO	densidade ótica
DP	desvio padrão
epm	erro padrão da média
IC	intervalo de confiança
rpm	rotações por minuto
HE	hemotoxilina-eosina
g	grama
Hz	hertz
prot	proteína
Kg	kilograma
dL	decilitro
mg	miligrama
ml	mililitro
Na ⁺	sódio

Ca^{++}		cálcio
NaCl		cloreto de sódio
$\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$		sódio/potássio
KCl		cloreto de potássio
nmol		nanomol
μmol		micromol
nm		nanômetro
O_2		oxigênio
H_2O_2		peróxido de hidrogênio
CO_2		dióxido de carbono
FiO_2		fração inspirada de oxigênio
Pg		picograma
U		unidade
vs		versus

LISTA DE SIGLAS

NF-kB		fator nuclear kappa B
ATP		adenosina trifosfato
ADP		adenosina difosfato
AMP		adenosina monofosfato
DNA		ácido desoxirribonucleico
ERO		espécies reativas de oxigênio

PTX	pentoxifilina
FMUSP	Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
I/R	isquemia-reperfusão
LIM/37	laboratório de investigação médica da FMUSP
MDA	malondialdeído
MPO	mieloperoxidase
m-RNA	ácido ribonucleico mensageiro
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
XO	xantina-oxidase

RESUMO

Le Champion ER. *Efeitos da administração endovenosa de pentoxifilina na isquemia-reperfusão pancreática: estudo experimental em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O pâncreas é um órgão suscetível a lesões de isquemia-reperfusão (I/R). Estratégias terapêuticas para reduzir os danos produzidos pela I/R podem melhorar os resultados nos transplantes de pâncreas-rim. Apesar dos efeitos hemorreológicos da pentoxifilina, esta droga tem ação anti-inflamatória através da inibição da ativação de NF- κ B e da produção de TNF- α . Foi demonstrado previamente que a pentoxifilina diminui a resposta inflamatória em modelos experimentais de pancreatite aguda e I/R hepática. Assim, a pentoxifilina pode contribuir na redução da lesão pancreática e da resposta inflamatória sistêmica em um modelo de I/R pancreática. **Objetivo:** Avaliar o efeito da administração de pentoxifilina em um modelo experimental de I/R pancreática em ratos. **Métodos:** A I/R pancreática foi realizada em sessenta ratos Wistar, por um período de uma hora através da oclusão da artéria esplênica. Os animais deste experimento foram divididos em três grupos: Grupo 1 (sham; realizado procedimento cirúrgico sem indução da I/R), grupo 2 (controle; realizado indução da I/R) que recebeu solução salina por via endovenosa e grupo 3 (pentoxifilina; realizado indução da I/R associado ao tratamento) que recebeu pentoxifilina (25mg/kg) por via endovenosa. Foram colhidas amostras de sangue para dosagem de amilase, creatinina, ureia, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10). Os níveis de malondialdeído (MDA) pancreático, da mieloperoxidase (MPO) pulmonar e a histologia pancreática também foram avaliados. **Resultados:** A inibição do TNF- α pela pentoxifilina apresentou efeitos benéficos neste modelo experimental. O grupo de animais tratados com pentoxifilina apresentou níveis séricos significativamente menores de TNF- α , IL-6 e IL-10 em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significantes entre estes grupos em relação aos níveis de amilase, creatinina, ureia, MDA pancreático e MPO pulmonar. Entretanto, no grupo de animais tratados com pentoxifilina, o dano histológico pancreático foi menor em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). **Conclusão:** A administração de pentoxifilina reduziu a resposta inflamatória sistêmica e a lesão histológica pancreática.

Descritores: 1. Pâncreas 2. Isquemia 3. Reperfusão 4. Traumatismo por reperfusão 5. Pentoxifilina 6. Fator de necrose tumoral alfa

ABSTRACT

Le Campion ER. *Effects of administration of pentoxifylline in pancreatic ischemia-reperfusion injury: experimental study in rats* [Thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brasil); 2015.

Introduction: The pancreas is an organ extremely susceptible to periods of ischemia. Therapeutic strategies to reduce the occurrence of pancreatic ischemia-reperfusion (I/R) injury might improve outcomes in human pancreas and kidney transplantation. In addition to its haemorrhologic effects, pentoxifylline has an anti-inflammatory effect by inhibiting NF- κ B activation and TNF- α production. It has been previously demonstrated that pentoxifylline induces an anti-inflammatory response in acute pancreatitis and liver I/R models. This led to the hypothesis that pentoxifylline might reduce pancreatic lesion and the systemic inflammatory response in pancreatic I/R injury. **Objective:** The aim of this experimental study was to evaluate the effect of pentoxifylline administration in a rat model of pancreatic I/R injury. **Methods:** Pancreatic I/R was performed in sixty Wistar rats over one hour by clamping the splenic vessels. The animals of this study were divided into three groups: group 1 (sham, surgical procedure without pancreatic I/R induction), group 2 (control, I/R induction) received saline solution administered intravenously, and group 3 (pentoxifylline, I/R induction plus treatment) rats received pentoxifylline (25 mg/kg) administered intravenously. Blood samples were collected to enable the determination of amylase, creatinine, urea, tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10). Pancreatic malondialdehyde (MDA) content, pulmonary myeloperoxidase (MPO) and pancreas histology were also assessed. **Results:** Inhibition of TNF- α by pentoxifylline shows beneficial effects in this experimental model. Significant reductions in serum TNF- α , IL-6 and IL-10 were observed in pentoxifylline group compared with control group ($p < 0.05$). No significant differences in serum amylase, creatinine, urea, pancreatic MDA or pulmonary MPO were observed between these two groups. However, the pancreatic histological damage was significantly lower in pentoxifylline treated group compared with control group ($p < 0.05$). **Conclusion:** Pentoxifylline administration reduced the systemic inflammatory response and the pancreatic histological lesion.

Descriptors: 1. Pancreas 2. Ischemia 3. Reperfusion 4. Reperfusion injury
5. Pentoxifylline 6. Tumor necrosis factor alpha

1. INTRODUÇÃO

A lesão de isquemia-reperfusão (I/R) é uma síndrome caracterizada por alterações funcionais e estruturais, que se tornam evidentes após o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia. Apesar da restauração do fluxo sanguíneo a um órgão isquêmico ser essencial para prevenir o dano celular irreversível, a reperfusão pode agravar este dano celular. Existem evidências de que períodos de isquemia e reperfusão podem causar pancreatite aguda^{1,2,3,4}. Além disso, sabe-se que a gravidade desta doença está relacionada com a extensão da lesão pancreática e com a intensidade da resposta inflamatória sistêmica^{5,6,7,8}.

O mecanismo de I/R tem sido pouco atribuído como fator etiológico principal da pancreatite aguda, ou fazendo parte do processo fisiopatológico de pancreatites desencadeadas por outros agentes etiológicos. Entretanto, a I/R é um fenômeno relativamente frequente em numerosas intervenções e situações clínicas, especialmente em transplantes de órgãos⁹.

O pâncreas por sua vez, é um órgão susceptível a lesões por I/R, que podem ser desencadeadas por alterações hemodinâmicas decorrentes de sepse ou choque hipovolêmico, de cirurgias com clampeamento arterial (artéria aorta ou tronco celíaco), além do transplante pancreático. Neste último caso, a lesão por I/R ocorre devido a uma interrupção do fluxo sanguíneo ao tecido pancreático com consequente reperfusão do mesmo. Este evento pode causar pancreatite aguda com desordens tanto locais como sistêmicas, afetando a recuperação adequada de pacientes após o transplante¹⁰.

O transplante de pâncreas é indicado para pacientes portadores de diabetes mellitus tipo I com complicações graves, associado ou não à uremia, objetivando estabelecer a normalização da glicemia e da hemoglobina glicosilada. Apesar dos novos protocolos de imunossupressão, da melhoria das soluções de preservação e do desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas, a I/R ainda é uma importante causa de lesão tecidual neste tipo de transplante¹¹. Alguns estudos experimentais identificaram mediadores envolvidos neste tipo de resposta inflamatória, e esta, por sua vez, está associada a alterações na microcirculação tais como aumento da permeabilidade vascular, vasoconstricção arterial, estase venocapilar e altos níveis séricos de enzimas pancreáticas¹². Estas alterações podem desencadear complicações pós-operatórias graves, como pancreatite aguda, trombozes, infecções e perda do enxerto pancreático¹³.

Do ponto de vista biomolecular, sabe-se que durante a fase de isquemia pancreática, a adenosina trifosfato (ATP) é degradada a adenosina monofosfato (AMP), a adenosina e posteriormente em hipoxantina, que passam pela membrana mitocondrial e posteriormente são acumuladas no citoplasma celular. Esta degradação dos níveis de ATP intracelular, compromete o funcionamento da bomba Na^+/K^+ , aumentando o influxo de sódio e portando, de água, com consequente edema celular¹⁴. Com a persistência da isquemia, alterações da homeostase intracelular culminam com ativação de enzimas causando maior dano na célula. A partir disso, no início da reperfusão, durante a primeira hora após a restituição do fluxo sanguíneo no tecido pancreático, com a oferta de oxigênio ocorre a ativação do sistema xantina/xantina oxidase, com a oxidação da hipoxantina e formação de superóxidos associado a liberação de espécies reativas de oxigênio (EOR)¹⁵. Essas substâncias por sua vez, causam diretamente lesão celular, com

participação na ativação inflamatória sistêmica, na ativação de neutrófilos e na gênese da pancreatite aguda secundária a I/R (Figura 1)^{16,17,18}.

Outro importante mecanismo, o qual as EROs causam lesão tecidual, de forma indireta, é através da peroxidação lipídica, evento que ocorre no processo de I/R de diversos órgãos^{19,20}. De fato, esses radicais livres de oxigênio atacam ácidos lipídicos poliinsaturados da membrana celular, iniciando o processo de peroxidação lipídica. Este por sua vez, degrada a membrana celular, favorecendo o influxo de substâncias (como íons de cálcio) e consequente formação de alguns produtos, como o malondialdeído (MDA), que causam mais instabilidade celular e liberação de precursores enzimáticos pelo ácino pancreático, com posterior ativação enzimática e consequente lesão tecidual²¹. A peroxidação lipídica não só inicia, mas propaga todo o processo de estresse oxidativo, mantendo relação direta entre o tempo de isquemia e a intensidade da lesão tecidual. Assim, algumas terapias utilizando agentes antioxidantes podem diminuir a produção de MDA e EROs, diminuindo a lesão tecidual pancreática.

A resposta inflamatória na pancreatite aguda secundária a I/R, se caracteriza por um processo sistêmico, com liberação em cascata de mediadores inflamatórios, tais como interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 10 (IL-10) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)^{12,22,23,24}. A liberação de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , em conjunto com a ativação de neutrófilos, são responsáveis não só pelo dano pancreático, mas também pela lesão de órgãos à distância, como comprometimento do tecido pulmonar, instabilidade hemodinâmica, insuficiência renal e alteração da permeabilidade capilar, fenômenos que caracterizam a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, podendo levar a falência de múltiplos órgãos e sistemas^{25,26,27}.

Figura 1. Representação da lesão de I/R pancreática. Isquemia: consumo de ATP com acúmulo de hipoxantina no citoplasma celular. Bloqueio da bomba Na^+/K^+ , ocasionando influxo de sódio e água para o citoplasma celular. Reperusão: a xantina oxidase (XO) oxida a hipoxantina, liberando as EROs, causando diretamente lesão do ácino pancreático com a participação de mediadores inflamatórios ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 e fator de ativação plaquetária-PAF).

Devido às consequências que a resposta inflamatória sistêmica traz para os pacientes, várias entidades tem concentrado esforços em pesquisa, seja através de estudos clínicos ou experimentais, no intuito de esclarecer os mecanismos e os principais mediadores envolvidos na fisiopatogenia da pancreatite aguda^{28,29,30,31,32,33}.

O TNF- α , que é produzido predominantemente por macrófagos, tem papel fundamental no início da cascata inflamatória desencadeada pela pancreatite aguda³⁴. Assim, após ser produzido e liberado, o TNF- α liga-se a receptores específicos na membrana celular, desencadeando a ativação de neutrófilos, o aumento da permeabilidade vascular e a produção de outras citocinas pro-inflamatórias como IL-1 e IL-6³⁵. Ao final dessa resposta inflamatória, por mecanismos pouco conhecidos, acredita-se que o TNF- α seja um dos principais responsáveis pela apoptose do ácino pancreático na I/R pancreática³⁵. Todos esses mecanismos podem levar a consequências devastadoras para os pacientes submetidos ao transplante de pâncreas isolado ou pâncreas-rim.

A pancreatite aguda do enxerto como resultado da I/R tem uma incidência de 17% a 35%, e é uma importante causa da perda do enxerto e de disfunção renal, aumentando a morbidade de pacientes submetidos ao transplante de pâncreas^{36,37}. Acredita-se que parte dessa patogênese está relacionada aos mecanismos previamente descritos. Diante disto, o uso de substâncias no intuito de bloquear os mediadores inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória sistêmica desses pacientes, vem sendo estudado em modelos experimentais.^{38,39,40,41}

A pentoxifilina (1-[5-oxohexil]-3,7-dimetilxantina), um derivado da metilxantina, tem propriedades hemorreológicas, com capacidade de aumentar a

deformidade das células sanguíneas, diminuindo a viscosidade sanguínea e a agregação plaquetária, com consequente redução na formação de trombos⁴². Assim, a pentoxifilina foi utilizada inicialmente no tratamento de doenças vasculares periféricas por melhorar a microcirculação.

Além desses efeitos, estudos prévios demonstraram importantes propriedades anti-inflamatórias desta droga, principalmente devido a sua ação inibitória sobre o TNF- α ^{43,44}. Um estudo recente demonstrou não só este tipo de ação na pancreatite aguda experimental, mas também demonstrou que a pentoxifilina diminuiu a taxa de infecção pancreática e a mortalidade⁴⁵.

Existem evidências de que a transcrição do ácido ribonucleico mensageiro (m-RNA) para a produção de citocinas inflamatórias nos monócitos seja bloqueada pela pentoxifilina^{46,47}. O fator nuclear kappa B (NF-kB) é um complexo proteico que tem função de transcrição, ou seja, ele é responsável pela extração de informações genéticas do ácido desoxirribonucleico (DNA) para formação de uma molécula de ácido ribonucleico mensageiro (m-RNA), que irá ser utilizada para produção de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α ⁴⁶. A pentoxifilina bloqueia diretamente a produção de citocinas, através da inibição da ativação do NF-kB. Tal efeito inibitório foi comprovado em estudo anterior, o qual a pentoxifilina inibiu a transcrição do m-RNA responsável pela produção de TNF- α ⁴⁷.

Com base nestes efeitos, alguns autores estudaram a ação da PTX em modelos experimentais de I/R de órgãos abdominais, mostrando um efeito protetor da droga na síndrome da resposta inflamatória sistêmica, evidenciado por menor produção TNF- α e diminuição do estresse oxidativo^{48,49,50,51}. De fato, em um estudo, a PTX reduziu a produção de TNF- α , o edema pulmonar e a peroxidação

lipídica na I/R intestinal em ratos⁵¹. Outro estudo mais recente, demonstrou também importante efeito protetor no fígado na I/R hepática, bem como melhora do débito cardíaco de ratos tratados com PTX⁵². Apesar disso, não há estudos avaliando os efeitos da PTX na I/R pancreática.

Dentro deste cenário, terapias com drogas anti-inflamatórias que diminuam a resposta inflamatória local e sistêmica na I/R pancreática, podem diminuir o número de complicações (como a pancreatite aguda) nos pacientes submetidos ao transplante de pâncreas isolado ou pâncreas-rim.

2. OBJETIVOS

Estudar os efeitos da administração da pentoxifilina na I/R pancreática, sobre a resposta inflamatória sistêmica e a histologia pancreática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica (LIM/37) da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 – Aspectos éticos

Previamente ao início da execução deste projeto, o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, HC-FMUSP). Respeitaram-se as normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação, segundo a lei 11.794 de 08 de Outubro de 2008 e segundo o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 1996.*

3.2 – Animais do experimento

Foram utilizados sessenta ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Laboratório de Investigação Médica – LIM 37, em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada entre 20 e 22°C, com alimentação Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA) e hidratados com água filtrada *ad libitum*, porém ficaram 12 horas de jejum antes do procedimento.

3.3 – Indução da I/R pancreática.

O modelo de I/R pancreática foi realizado conforme descrito em estudo prévio¹⁷. O procedimento seguiu a seguinte sequência: anestesia dos animais com administração intraperitoneal com solução contendo cloridrato de cetamina (Ketalar®, Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 30mg/kg e cloridrato de xilazina (Ropum®, Bayer, São Paulo, Brasil) a 10mg/kg, permitindo que os animais permanecessem anestesiados durante todo o procedimento. Depois da anestesia, os animais foram submetidos à intubação orotraqueal com cateter nº16 (Jelco®) e ventilação mecânica (Harvard Rodent Ventilator model 683, USA) com frequência respiratória de 60 ciclos por minuto, volume corrente de 0,08ml por grama de peso e FiO₂ de 0.21 (Small Animal Ventilator model 683, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Durante o procedimento os animais tiveram a temperatura corporal monitorizada por termômetro retal digital (YSI Precision 4000^a Thermometer, USA), e mantida entre 36 a 37°C. Foi realizado posteriormente tricotomia abdominal e antissepsia com polivinil-pirrolidona-iodo.

A seguir foi realizada abertura da cavidade através de incisão mediana infra-xifoidea de aproximadamente 2,0 cm, reparando-se o estômago cranialmente com fio de sutura (Nylon® 5-0) (Figura 2). Para minimizar o trauma pancreático durante o procedimento, foi utilizada técnica “no-touch”, utilizando o baço como apoio. O pâncreas então foi cuidadosamente separado do estômago e os vasos gástricos curtos ligados (Figura 3). Com isso, procedeu-se o isolamento vascular completo da porção caudal do pâncreas.

A isquemia de toda a cauda pancreática foi realizada através da oclusão dos vasos esplênicos em sua origem com pinça microvascular atraumática

(Figura 4). Após a indução da isquemia, a cavidade peritoneal foi fechada com fio de sutura (Nylon® 5-0). O período total de isquemia foi de sessenta minutos, sendo então realizado abertura da cavidade peritoneal e liberação da pinça vascular dos vasos esplênicos com consequente reperfusão da cauda pancreática. A incisão foi novamente fechada com sutura contínua (Nylon® 5-0). O animal, devolvido à gaiola individual, foi mantido aquecido após a recuperação anestésica.

Figura 2. Cauda do pâncreas presa ao baço, que é usado como apoio. Nota-se o estômago reparado cranialmente com fio (Nylon® 5-0).

Figura 3. Vasos gástricos curtos sendo ligados (seta) e posteriormente seccionados para isolamento completo da cauda do pâncreas.

Figura 4. Isquemia da cauda do pâncreas com pinça microvascular atraumática (seta).

3.4 – Delineamento experimental

Os animais foram divididos em três grupos (Figura 5):

Grupo I - Sham: constituído por vinte animais que foram submetidos apenas à realização do procedimento cirúrgico, com abertura da cavidade peritoneal, reparo cranial do estômago e isolamento da porção caudal do pâncreas, sem a indução da I/R pancreática. Estes animais foram sacrificados em quatro e vinte e quatro horas após a reperfusão para a dosagem sérica de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, and IL-10), amilase, ureia e creatinina. Também foram analisados os níveis de MDA no tecido pancreático, a atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar e a histologia pancreática.

Grupo II – Controle: constituído por vinte animais que foram submetidos à indução da I/R pancreática como previamente descrito e posterior administração de solução salina estéril 1,25 ml/Kg por via endovenosa. Estes animais foram sacrificados em quatro e vinte e quatro horas após a reperfusão para a dosagem sérica de mediadores inflamatórios (IL6, IL10 e TNF- α), amilase, ureia, e creatinina. Também foram analisados os níveis de MDA no tecido pancreático, a atividade da MPO no tecido pulmonar e a histologia pancreática.

Grupo III – Pentoxifilina (PTX): constituído de vinte animais, que foram submetidos à indução da I/R pancreática como previamente descrito e posterior administração de pentoxifilina 25mg/kg (1,25 ml/Kg) por via endovenosa. Estes animais foram sacrificados em quatro e vinte e quatro horas após a reperfusão para a dosagem sérica de mediadores inflamatórios (IL6, IL10 e TNF- α), amilase, ureia, e creatinina.

Também foram analisados os níveis de MDA no tecido pancreático, a atividade da MPO no tecido pulmonar e a histologia pancreática.

Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental.

* No grupo II (controle), administração endovenosa de NaCl 0,9% após 45 minutos de isquemia.

* No grupo III (pentoxifilina), administração endovenosa de pentoxifilina após 45 minutos de isquemia.

4h ⇒ Coleta de material para análise (TNF-α, IL-6, IL-10, amilase, ureia, creatinina e MDA).

24h ⇒ Coleta de material para análise (amilase, ureia, creatinina, atividade da MPO, histologia pancreática).

3.5 – Administração da pentoxifilina e solução salina

As soluções foram administradas por via endovenosa através de punção com agulha de insulina da veia peniana e injetadas pelo período de cinco minutos. Todas as drogas foram administradas 15 minutos antes da liberação da pinça vascular e reperfusão do pâncreas, ou seja, 45 minutos após o início do período de isquemia.

A pentoxifilina (Trental™, Sanofi Aventis Pharma, Sao Paulo, Brasil), foi administrada na dose de 25mg/kg (1,25ml/kg). A solução salina fisiológica a 0,9% foi administrada na dose de 1,25ml/kg. As duas substâncias foram re-administradas 12 horas após a reperfusão para os animais estudados nas 24 horas após a isquemia.

3.6 – Coleta dos materiais para análise.

Os animais foram então anestesiados com Ketalar® na dose de 40mg/kg e exsanguinados para coleta de amostras de sangue e tecidos (pâncreas e pulmão).

Após recuperação anestésica dos animais, e após cada período acima mencionado (4 e 24 horas após a reperfusão), os animais foram novamente anestesiados com Ketalar®, na dose de 40 mg/kg injetado pela veia peniana. Amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca e os animais foram sacrificados por exsanguinação. Níveis séricos de amilase, mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, e IL-10), ureia e creatinina foram analisados.

O tecido pancreático foi obtido da porção caudal do pâncreas, que foi submetido previamente à I/R, e foram feitas dosagens dos níveis de MDA e análise histológica. O pulmão foi removido para quantificação da atividade da MPO neste tecido.

3.7 – *Análise dos materiais coletados*

3.7.1 – Mediadores inflamatórios

Foram colhidas amostras de sangue 4 horas após a reperfusão pancreática para dosagem dos seguintes mediadores inflamatórios: TNF- α , IL-6 e IL-10. Estas amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 0°C e os sobrenadantes estocados a -20°C. Os resultados foram expressos em pg/ml.

A determinação quantitativa dos mediadores inflamatórios foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) através da utilização de kits comerciais (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA).

3.7.2 – Amilase, ureia e creatinina

Foram colhidas amostras de sangue 4 horas e 24 horas após a reperfusão pancreática para dosagem sérica de amilase, ureia e creatinina. A determinação da atividade da amilase foi realizada pelo método colorimétrico de Jamieson⁵³ e os resultados foram expressos em U/ml, sendo que 1 unidade de atividade de amilase corresponde a 1 μ mol de maltose liberada por minuto.

As análises de ureia e creatinina foram feitas pelo método enzimático colorimétrico, sendo os resultados expressos em mg/dL.

3.7.3 –Peroxidação lipídica

A quantificação da peroxidação lipídica no tecido pancreático após 4 hora da reperfusão foi realizada através da determinação da concentração de MDA por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram homogeneizadas em KCl, centrifugadas, e no sobrenadante foi adicionada uma solução contendo ácido tiobarbitúrico, duodecilsulfato de sódio, ácido acético glacial e água destilada. A mistura foi aquecida a 90°C por 45 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas (15.000rpm, por 10 minutos). As concentrações dos produtos da peroxidação lipídica foram expressas pela concentração de TBARS. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína⁵⁴.

3.7.4 – Atividade da mieloperoxidase pulmonar

A atividade da MPO pulmonar foi utilizada como indicador da presença de neutrófilos sequestrados no pulmão sendo avaliada no período de 24 horas após a reperfusão. As amostras foram homogeneizadas com homogeneizador Polytron, usando tampão PBS contendo 0,5% de hexadecil e 5mM EDTA, pH 6,0. As amostras homogeneizadas foram submetidas ao ultrassom (40Hz) e, posteriormente, centrifugadas a 3000g por minuto. A atividade da MPO no sobrenadante foi quantificada através da densidade óptica (DO) a 490nm resultante da decomposição de H_2O_2 na presença de O-dianisina^{55,56}. Os resultados foram expressos em DO a 490nm.

3.7.5 – Análise histológica

Fragmentos da porção caudal do pâncreas foram fixados em solução contendo aldeído fórmico a 10% imediatamente após a coleta e encaminhados para o laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram incluídos em parafina, cortados em espessura de cinco micrômetros, corados através da técnica de hematoxilina-eosina (HE) e observados à microscopia óptica.

A avaliação do tecido pancreático foi realizada através da classificação proposta por Schmidt *et al*⁵⁷, analisando as seguintes variáveis: edema, necrose acinar, inflamação e infiltrado perivascular, necrose gordurosa e hemorragia (Tabela 1). Esta avaliação foi feita 24 horas após a reperfusão pancreática.

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

Tabela 1. Classificação do processo inflamatório do tecido pancreático proposta por Schmidt *et al.*⁵⁷

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

3.8 – Análise estatística

Os resultados das dosagens de TNF- α , IL-6, IL-10, amilase, ureia, creatinina, MDA e MPO estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm) e foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença estatística foi aplicado o teste de Tukey^{58,59}. Quando comparados grupos dois a dois, utilizou-se o teste *t* de Student^{58,59}.

Os resultados da análise histológica do pâncreas, ou seja, do edema, da necrose acinar, necrose gordurosa, hemorragia, inflamação e infiltrado perivascular são apresentados como mediana e foram analisados utilizando teste de Kruskal-Wallis^{58,59}.

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico *GraphPadPrism* versão 4.0 e o nível de significância considerado foi de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 – Dosagem de mediadores inflamatórios

4.1.1 – TNF- α

A dosagem sérica de TNF- α nos animais do grupo sham foi indetectável. Altos níveis desta citocina inflamatória foram observados nos animais do grupo controle. Houve redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α no grupo PTX quando comparado ao grupo controle (gráfico 1 e tabela 2).

Gráfico 1. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de TNF- α . *Grupo de ratos submetidos a I/R sem tratamento (controle) vs grupo de ratos tratados com PTX. $p=0,001$.

4.1.2 – Interleucinas 6 e 10

Os níveis séricos de IL-6 estavam indetectáveis nos animais do grupo sham. Altos níveis de IL-6 e IL-10 foram observados nos animais do grupo

controle. Entretanto, os animais que receberam a administração de pentoxifilina apresentaram redução significativa dos níveis de IL-6 e IL-10 quando comparados ao grupo controle (gráficos 2 e 3; tabela 2).

Gráfico 2. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de IL-6.*Grupo de ratos submetidos a I/R sem tratamento (controle) vs grupo de ratos tratados com PTX. $p=0,03$.

Gráfico 3. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de IL-10.*Grupo de ratos submetidos a I/R sem tratamento (controle) vs grupo de ratos tratados com PTX. $p=0,01$.

4.1.3 – Relação $\text{TNF-}\alpha$ /Interleucina 10

Foi observada uma redução estatisticamente significativa da relação $\text{TNF-}\alpha$ /IL-10 nos animais do grupo PTX, mostrando uma maior prevalência da atividade anti-inflamatória deste grupo em relação ao grupo controle (gráfico 4).

Gráfico 4. Valores das médias $\pm$ epm das razões de TNF- α /IL-10 no sangue. *Grupo de ratos submetidos a I/R sem tratamento (controle) vs grupo de ratos tratados com PTX. $p=0,03$.

Tabela 2. Mediadores inflamatórios. Valores das médias $\pm$ DP das dosagens séricas de TNF- α , IL-6 e IL-10.

	Grupos			p
	Controle	Pentoxifilina	Sham	
TNF-α	48 $\pm$ 29,7	2,6 $\pm$ 5,6	0 $\pm$ 0 -	< 0,001*
IL – 6	445,00 $\pm$ 455	102,60 $\pm$ 80	0 $\pm$ 0 -	0,002*
IL – 10	135,80 $\pm$ 96	49,10 $\pm$ 10	30,70 $\pm$ 22	0,001*

4.2 – Dosagem de amilase

Após 4 horas da reperfusão pancreática, foi observado um aumento significativo dos níveis séricos da amilase nos animais dos grupos que foram submetidos à I/R pancreática (grupos controle e PTX) quando comparados ao grupo sham (gráfico 5). Não foram observadas diferenças significativas nos resultados desta enzima após 4 horas de reperfusão entre os animais dos grupos sem tratamento (controle) e os tratados com pentoxifilina. No período de 24 horas após a reperfusão pancreática, foi observado um aumento significativo dos níveis séricos da amilase no grupo PTX quando comparados com o grupo sham (gráfico 6). Porém neste mesmo período, não foram observadas diferenças significativas entre os animais dos grupos sem tratamento (controle) e os tratados com pentoxifilina.

Gráfico 5. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de amilase após 4 horas da reperfusão pancreática. *Grupo de ratos submetidos à I/R (grupos controle e PTX) vs grupo sham. $p=0.01$.

Gráfico 6. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de amilase após 24 horas da reperfusão pancreática. * Grupo PTX v sgrupo sham. $p=0,01$

4.3 - Dosagem de ureia e creatinina

Analizando as dosagens séricas da ureia, após 4 horas e 24 horas da reperfusão pancreática, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (gráficos 7 e 8).

Após 4 horas da reperfusão pancreática, foi observado um aumento significativo dos níveis séricos da creatinina nos animais do grupo controle quando comparados ao grupo sham (gráfico 9). Neste mesmo período, não houve diferença estatisticamente significante entre os animais do grupo controle e do grupo PTX, porém os resultados mostram uma tendência na redução da disfunção renal neste

último grupo (gráfico 9). No período de 24 horas da reperfusão pancreática, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (gráfico 10).

Gráfico 7. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de ureia após 4 horas da reperfusão pancreática. $p=0,79$.

Gráfico 8. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de ureia após 24 horas da reperfusão pancreática. $p=0,34$.

Gráfico 9. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de creatinina após 4 horas da reperfusão pancreática.

*Grupo controle vs grupo sham. $p=0,03$

Grupo controle vs grupo PTX. $p=0,07$

Gráfico 10. Valores das médias $\pm$ epm dos níveis séricos de creatinina após 24 horas da reperfusão pancreática. $p=0,62$.

4.4 – Determinação da peroxidação lipídica

Os níveis de MDA no tecido pancreático 4 horas após a reperfusão foram maiores nos animais submetidos à I/R pancreática (grupos controle e PTX). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (gráfico 11).

Gráfico 11. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de MDA no tecido pancreático após 4 horas da reperfusão pancreática. $p=0,08$.

4.5 – Determinação da mieloperoxidase (MPO) pulmonar

Os resultados da atividade da MPO no tecido pulmonar 24 horas após a reperfusão pancreática, apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos que foram submetidos à I/R pancreática quando comparados aos do grupo sham (gráfico 12). Porém, não foram observadas diferenças significativas na atividade da MPO entre os grupos controle e PTX.

Gráfico 12. Valores das médias $\pm$ epm das dosagens de MPO no tecido pulmonar após 24 horas da reperfusão pancreática. *Grupo de ratos submetidos à I/R (grupos controle e PTX) vs grupo sham. $p=0,02$.

4.6 – Avaliação histológica

Os animais dos grupos que foram submetidos à I/R pancreática apresentaram algum tipo de lesão tecidual característica de pancreatite aguda: edema, necrose acinar, inflamação e infiltrado perivascular, necrose gordurosa e/ou hemorragia (Figura 5). Já, os animais do grupo sham apresentaram tecido pancreático normal.

Após 24 horas da reperfusão pancreática, houve redução significativa da lesão tecidual no pâncreas nos animais que receberam pentoxifilina quando comparados ao grupo controle (gráfico 13 e tabela 3).

Figura 6. Aspecto na microscopia de fragmento de pâncreas de rato submetido à I/R. Coloração hematoxilina-eosina, com aumento 400x. Presença de necrose gordurosa (1) e infiltrado inflamatório (2).

Gráfico 13. Representação dos valores dos escores histológicos no tecido pancreático após 24 horas da reperfusão pancreática, contendo os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo.

* Controle vs PTX. $p=0,03$
 Controle vs sham. $p=0,01$
 PTX vs sham. $p=0,02$

Tabela 3. Escores histológicos no tecido pancreático após 24 horas da reperfusão pancreática. Soma dos parâmetros (edema, necrose acinar, hemorragia, necrose gordurosa, inflamação e infiltrado perivascular) $\pm$ DP. IC (Intervalo de confiança). *Grupo PTX vs grupo controle.

	Grupos		
	Controle	PTX	Sham
Média $\pm$ DP	5,5 $\pm$ 2,68	3,0 $\pm$ 0,86*	1,75 $\pm$ 0,82
IC 95%	4,13 – 7,97	2,93 – 4,17	1,16 – 2,34

5. DISCUSSÃO

A administração endovenosa de PTX neste estudo experimental provocou alterações significativas nos animais submetidos à I/R pancreática. De fato, observamos uma diminuição da resposta inflamatória sistêmica, evidenciada por menor produção de citocinas inflamatórias e uma menor lesão tecidual no pâncreas. Além disso, pela primeira vez, foi estudado o efeito desta droga em um modelo experimental de I/R pancreática. Entretanto, o presente estudo apresentou alguma limitação na aquisição de instrumentos de monitorização hemodinâmica invasiva para animais de pequeno porte, não sendo possível assim, estudar os efeitos hemodinâmicos da PTX neste modelo de I/R.

O pâncreas é um órgão muito suscetível à isquemia, sendo esta a principal etiologia responsável pela pancreatite aguda após a reperfusão, por isso, o tempo de duração da isquemia e desta reperfusão está relacionado com a gravidade da resposta inflamatória após o fenômeno de I/R⁶⁰. Não há um consenso na literatura em relação ao tempo de isquemia que o pâncreas deve ser submetido para melhor avaliar as repercussões locais e sistêmicas deste processo. Neste modelo, utilizamos o tempo de isquemia de uma hora, como já utilizado em outros estudos^{61,62}. Entretanto, outros autores utilizaram tempos de isquemia variando de trinta minutos a duas horas^{24,63,64,65,66}.

A PTX é um derivado da metilxantina que inibe a enzima fosfodiesterase, sendo utilizada amplamente no tratamento de doenças vasculares crônicas. Isto se deve ao fato de que esta droga possui propriedades farmacológicas importantes, tais como atuar na diminuição da agregação plaquetária, aumentar a deformidade dos glóbulos vermelhos e diminuir a viscosidade sanguínea^{67,68}. Por outro lado, esta droga também tem uma ação anti-inflamatória, uma vez que ela diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias e bloqueia a produção de TNF- α ,

através da inibição da fosfodiesterase intracelular^{43,44}. Estas propriedades parecem reduzir a resposta inflamatória local e sistêmica, diminuindo os danos na síndrome de I/R.

A PTX já foi utilizada em modelos experimentais de I/R de outros órgãos, porém, não há um consenso em relação à dosagem exata que deve ser administrada. Estudos prévios utilizaram uma dosagem variando de 20mg/kg a 50mg/kg^{48,49,50,51,52,69,70,71,72}. Neste estudo, utilizamos a dosagem de 25mg/kg conforme publicado anteriormente por autores desta instituição^{45,73}. Além disso, dois estudos mostraram efeitos benéficos da PTX com esta dosagem na pancreatite aguda experimental^{45,74}.

Uma variedade de estudos têm mostrado um efeito protetor de algumas substâncias farmacológicas, como L-arginina, octreotide, N-acetilcisteína (NAC) e outras, na lesão de I/R^{20,37,61,75,76,77}. Aslamet *et al*⁷⁸ e Kaptanoglu *et al*⁷⁹ demonstraram que a utilização da PTX contribuiu para um efeito citoprotetor no fígado na I/R hepática, através do aumento dos níveis teciduais hepáticos de prostaglandina E2 e da diminuição dos níveis séricos de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST). Recentemente tem sido demonstrado que a administração da PTX pode atenuar a resposta inflamatória local e sistêmica, além de reduzir a infecção pancreática e a taxa de mortalidade na pancreatite aguda experimental^{45,80}.

A resposta inflamatória sistêmica é mediada por citocinas, e existem evidências de que os níveis séricos de TNF- α , IL-1 e IL-6 estão aumentados no início do curso de pancreatite aguda e são correlacionados com a severidade da doença^{30,81,82}. No presente estudo, o tratamento com PTX reduziu a resposta inflamatória sistêmica na I/R pancreática. De fato, após 4 horas da reperfusão, foi

observado uma diminuição significativa nos níveis séricos de TNF- α e IL-6 no grupo PTX quando comparado com o grupo controle (gráficos 1 e 2; tabela 2).

Os níveis séricos de IL-10 nesta fase da resposta inflamatória mantêm relação com os níveis séricos de TNF- α e de IL-6⁸³. Assim, quatro horas após a reperfusão pancreática, foi observado também uma redução significativa nos níveis séricos de IL-10 no grupo PTX quando comparado com o grupo controle (gráfico 3 e tabela 2). Por outro lado, ao se analisar a relação de citocinas pró-inflamatórias com citocinas anti-inflamatórias (proporção de TNF- α /IL-10), foi observada uma maior resposta anti-inflamatória no grupo tratado com a PTX, sugerindo uma ação benéfica desta droga (gráfico 4). Estudo adicional também demonstrou que o tratamento com PTX na I/R hepática causou uma diminuição significativa dos níveis séricos de TNF- α , devido à inibição da expressão de m-RNA para produção de TNF- α ⁴⁷.

A amilase sérica é um importante marcador utilizado na prática clínica no diagnóstico da inflamação pancreática, entretanto, níveis muito elevados desta enzima não constitui fator prognóstico^{84,85}. No presente estudo, o modelo experimental causou pancreatite aguda secundária à isquemia, situação que pode ocorrer nos pacientes submetidos ao transplante de pâncreas. De fato, foi observado níveis séricos de amilase significativamente elevados nos grupos de animais submetidos a I/R pancreática (controle e PTX)(gráficos 5 e 6), mostrando possivelmente o mesmo nível de lesão pancreática envolvendo os dois grupos. A administração de PTX entretanto, não reduziu os níveis séricos de amilase quando comparado com o grupo controle, sugerindo que esta droga não impede a pancreatite aguda, existindo outros mecanismos envolvidos na lesão pancreática

secundária a I/R, entre eles: a lesão endotelial e a produção de EROs. O mesmo resultado foi observado em outro estudo, utilizando NAC por via endovenosa durante a I/R pancreática⁶¹.

O modelo de I/R pancreática realizado neste estudo promoveu disfunção renal, caracterizada por níveis séricos de creatinina significativamente maiores no grupo controle em relação ao grupo sham (gráfico 9). Este efeito pode ter sido atribuído devido a uma maior resposta inflamatória causada pelo processo de I/R. Khoury *et al*⁷⁷ demonstrou que com quarenta minutos de isquemia pancreática, houveram mudanças importantes na pressão, no fluxo e na microcirculação renal, causando diminuição do débito urinário. Este autor atribuiu estas alterações à resposta inflamatória sistêmica e ao estresse oxidativo. Apesar disso, os níveis séricos de ureia no presente estudo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (gráficos 7 e 8).

Devido à propriedade anti-inflamatória da PTX em reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, esta droga poderia atuar melhorando a função renal quando administrada antes da reperusão pancreática. De acordo com este estudo, foi observada uma melhora na função renal com a administração de PTX, porém este resultado não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (gráfico 9; $p=0,072$). Um estudo anterior também demonstrou que a administração de PTX antes da reperusão foi incapaz de melhorar a função renal em um modelo experimental de I/R do membro posterior⁸⁶.

Como sabemos, a lesão ocasionada pela I/R leva a distúrbios microcirculatórios com lesão endotelial, ativação de neutrófilos e também gera EROs, podendo causar estresse oxidativo e consequente disfunção de múltiplos órgãos⁸⁷. A peroxidação lipídica está envolvida neste processo, produzindo alguns

metabólitos, como o MDA. Apesar dos níveis mais elevados de MDA no tecido pancreático nos animais submetidos a I/R pancreática (grupos controle e PTX), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (gráfico 11). Uma possível explicação para este fato, seria o curto período de isquemia realizado neste estudo, não sendo suficiente para estimular uma maior produção de EROs após a reperfusão pancreática. De fato, um estudo recente avaliou o estresse oxidativo na I/R pancreática utilizando espectrometria². Este estudo concluiu que com uma hora de isquemia pancreática, os níveis de EROs foram semelhantes aos animais do grupo controle, porém, quando realizou-se duas horas de isquemia, os níveis de EROs foram significativamente maiores.

Dados da literatura sobre o efeito da PTX sobre o estresse oxidativo são contraditórios. Sener *et al*⁸⁸ demonstrou que a utilização desta droga reduziu significativamente a peroxidação lipídica em um modelo experimental de I/R intestinal, evidenciado pela diminuição dos níveis de MDA no íleo. Porém, no presente estudo, foi observado que a administração de PTX não conseguiu reduzir significativamente o estresse oxidativo quando comparado com o grupo controle (gráfico 11). Um outro estudo mostrou resultados semelhantes, onde a PTX foi incapaz de reduzir a peroxidação lipídica em um modelo experimental de I/R secundária ao pneumoperitônio⁸⁹. Uma das razões que pode explicar a falta de eficácia da PTX na redução do estresse oxidativo encontra-se em sua atividade antioxidante relacionada à formação de radicais livres e na sua ação em relação à adesão dos neutrófilos. Evidências mostram que esta droga é capaz de reduzir a adesão dos neutrófilos ao endotélio e a formação de radicais livres^{90,91}. No entanto, a adesão dos neutrófilos ocorre na primeira hora do processo de I/R⁹², ao passo que no nosso estudo, o processo de I/R pancreática durou apenas uma hora, deixando a

possibilidade de que a PTX pode não ter exercido plenamente o seu efeito pela curta duração da isquemia. Assim, uma maior eficácia da droga sobre o estresse oxidativo poderia ter sido adquirida com uma isquemia mais prolongada.

Vinte e quatro horas após a reperfusão pancreática, foi observado neste estudo atividade da MPO no tecido pulmonar, indicando que a I/R induziu a infiltração de neutrófilos no pulmão com consequente lesão tecidual neste órgão (gráfico 12). No entanto, o tratamento com PTX não diminuiu a atividade desta enzima no tecido pulmonar em nosso modelo experimental. Assim, a inibição do TNF- α pela PTX não preveniu a inflamação pulmonar, provavelmente porque o TNF- α não é o único mediador responsável pelo desenvolvimento da infiltração neutrofílica ou a sua supressão não afeta outras vias de ativação da resposta inflamatória sistêmica. Em um estudo anterior, foi também observado que a pancreatite aguda experimental cursa com inflamação pulmonar, e a insuflação intraperitoneal de CO₂ atenuou a resposta inflamatória sistêmica mas não alterou a atividade da MPO pulmonar⁹³. Kim *et al*⁹⁴, entretanto, demonstrou que a utilização de ácido valpróico reduziu a migração de neutrófilos no tecido pulmonar na I/R intestinal em ratos.

Analisando os aspectos histológicos, foi observado que o grau de lesão tecidual presente no tecido pancreático foi reduzido com a administração de pentoxifilina (gráfico 13 e tabela 3), mostrando que esta droga pode ser capaz de interferir no grau de inflamação e lesão tecidual. Isto provavelmente ocorreu não só devido à redução da resposta inflamatória local, mas também devido à redução da resposta inflamatória sistêmica. De fato, outros estudos demonstraram que esta droga reduziu o dano tecidual local em alguns órgãos após a lesão de I/R^{16,69,70,71,95}.

Os resultados deste estudo apontam para uma nova alternativa terapêutica permitindo desta forma reduzir a resposta inflamatória, podendo diminuir os eventos adversos relacionados à I/R. Além disso, observamos que a administração endovenosa da PTX tem um efeito modulador na resposta inflamatória sistêmica, reduzindo os níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias, além de diminuir a lesão tecidual pancreática secundária a I/R deste órgão, condição que pode ocorrer nos pacientes submetidos ao transplante de pâncreas. No entanto, ensaios clínicos são necessários para confirmar os benefícios da PTX na prática clínica.

6. CONCLUSÕES

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

- A inibição da produção de TNF- α por meio da administração de pentoxifilina na I/R pancreática resultou na diminuição do processo inflamatório sistêmico, com redução de TNF- α , IL-6 e IL-10.
- A PTX reduziu o grau de lesão tecidual pancreática neste modelo de I/R.

7. ANEXOS

Anexo A. Valores individuais das dosagens de TNF- α no soro dos animais dos grupos sham, controle e PTX.

GRUPO SHAM

Ratos	TNF-α(pg/ml)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
N=10	
Média	0
DP	0
EPM	0

GRUPO CONTROLE

Ratos	TNF-α(pg/ml)
1	39
2	91
3	29
4	60
5	36
6	37
7	52
8	101
9	37
10	0
N=10	
Média	48
DP	29,7
EPM	9

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	TNF-α(pg/ml)
1	16
2	0
3	0
4	10
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
N=10	
Média	2,6
DP	5,6
EPM	2

Anexo B. Valores individuais das dosagens de IL-6 e IL-10 no soro dos animais dos grupos sham, controle e PTX.

GRUPO SHAM

Ratos	IL-6(pg/ml)	IL-10(pg/ml)
1	0	0
2	0	41
3	0	41
4	0	43
5	0	46
6	0	53
7	0	46
8	0	37
9	0	0
10	0	0
N=10		
Média	0	31
DP	0	22
EPM	0	7

GRUPO CONTROLE

Ratos	IL-6 (pg/ml)	IL-10(pg/ml)
1	1079	124
2	168	283
3	1185	311
4	169	42
5	123	152
6	164	46
7	167	77
8	252	72
9	1036	178
10	107	73
N=10		
Média	445	136
DP	455	96
EPM	144	30

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	IL-6(pg/ml)	IL-10(pg/ml)
1	78	42
2	213	33
3	252	59
4	155	46
5	103	42
6	64	53
7	54	40
8	57	52
9	50	63
10	0	61
N=10		
Média	103	49
DP	80	10
EPM	25	3

Anexo C. Valores individuais das dosagens de amilase no soro dos animais dos grupos sham, controle e PTX, 4 horas após a reperfusão pancreática.

GRUPO SHAM

Ratos	Amilase(U/ml)
1	5,6
2	6,3
3	5,3
4	6,4
5	5,9
6	5,9
7	5,1
8	7,1
9	6,9
10	5,2
N=10	
Média	6,0
DP	0,7
EPM	0,22

GRUPO CONTROLE

Ratos	Amilase(U/ml)
1	7,8
2	7,7
3	11,4
4	6,1
5	7,1
6	6,9
7	8,3
8	7,5
9	13,2
10	9,6
N=10	
Média	8,6
DP	2,2
EPM	0,7

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	Amilase(U/ml)
1	9,8
2	9,2
3	10,1
4	11,0
5	5,8
6	7,1
7	8,3
8	10,5
9	7,9
10	9,4
N=10	
Média	8,8
DP	2,0
EPM	0,6

Anexo D. Valores individuais das dosagens de amilase no soro dos animais dos grupos sham, controle e PTX, 24 horas após a reperfusão pancreática.

GRUPO SHAM

Ratos	Amilase(U/ml)
1	9,3
2	8,3
3	9,8
4	8,1
5	8,7
6	10,4
7	10,4
8	7,1
9	9,5
10	9,2
N=10	
Média	9,1
DP	1,0
EPM	0,3

GRUPO CONTROLE

Ratos	Amilase(U/ml)
1	29,5
2	11,1
3	8,5
4	15,8
5	10,1
6	9,0
7	8,3
8	14,8
9	9,3
10	11,7
N=10	
Média	12,8
DP	6,4
EPM	2,0

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	Amilase(U/ml)
1	11,6
2	9,6
3	14,6
4	13,9
5	8,2
6	12,7
7	10,3
8	22,6
9	12,7
10	15,4
N=10	
Média	13,2
DP	4,0
EPM	1,3

Anexo E. Valores individuais das dosagens de ureia e creatinina no soro dos animais dos grupos sham, controle e PTX, 4 horas após a reperfusão pancreática.

GRUPO SHAM

Ratos	Ureia(mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	21	0,4
2	21	0,3
3	18	0,4
4	26	0,4
5	28	0,4
6	28	0,3
7	28	0,5
8	58	0,4
9	42	0,4
10	42	0,4
N=10		
Média	31	0,4
DP	12	0,1
EPM	3,8	0,03

GRUPO CONTROLE

Ratos	Ureia(mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	38	1,4
2	53	1,3
3	38	0,9
4	14	0,3
5	18	0,4
6	16	0,4
7	20	0,5
8	23	0,5
9	73	0,7
10	27	0,4
N=10		
Média	32	0,7
DP	19	0,4
EPM	6	0,1

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	Ureia(mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	21	0,4
2	57	0,3
3	35	0,3
4	57	0,5
5	39	0,2
6	36	0,6
7	29	0,5
8	32	0,5
9	26	0,5
10	23	0,5
N=10		
Média	36	0,4
DP	13	0,1
EPM	4	0,03

Anexo F. Valores individuais das dosagens de ureia e creatinina no soro dos animais dos grupos sham, controle e PTX, 24 horas após a reperfusão pancreática.

GRUPO SHAM

Ratos	Ureia(mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	26	0,6
2	34	0,5
3	34	0,3
4	23	0,4
5	17	0,4
6	14	0,3
7	39	0,8
8	27	0,3
9	17	0,4
10	21	0,5
N=10		
Média	25	0,5
DP	8	0,2
EPM	2,5	0,06

GRUPO CONTROLE

Ratos	Ureia(mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	56	0,5
2	17	0,3
3	19	0,3
4	90	1,1
5	20	0,3
6	23	0,4
7	14	0,3
8	12	0,4
9	10	0,4
10	18	0,4
N=10		
Média	28	0,4
DP	25	0,2
EPM	8	0,06

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	Ureia(mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	13	0,3
2	20	0,4
3	14	0,3
4	13	0,3
5	17	0,3
6	18	0,4
7	16	0,4
8	39	0,5
9	12	0,5
10	14	0,4
N=10		
Média	18	0,4
DP	8	0,1
EPM	3	0,03

Anexo G. Valores individuais das dosagens de MDA no tecido pancreático dos animais dos grupos sham, controle e PTX.

GRUPO SHAM

Ratos	MDA(nmol/mg proteína)
1	1,50
2	1,49
3	1,32
4	0,76
5	1,36
6	1,00
7	2,30
8	1,90
9	1,32
10	1,25
N=10	
Média	1,42
DP	0,43
EPM	0,13

GRUPO CONTROLE

Ratos	MDA(nmol/mg proteína)
1	1,40
2	1,30
3	1,30
4	1,60
5	2,00
6	2,60
7	1,70
8	1,70
9	3,70
10	3,70
N=10	
Média	2,10
DP	0,93
EPM	0,29

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	MDA(nmol/mg proteína)
1	2,50
2	1,20
3	1,80
4	2,00
5	2,20
6	1,30
7	2,10
8	1,90
9	2,00
10	3,90
N=10	
Média	2,09
DP	0,75
EPM	0,24

Anexo H. Valores individuais das dosagens de MPO no tecido pulmonar dos animais dos grupos sham, controle e PTX.

GRUPO SHAM

Ratos	MPO
1	0,038
2	0,036
3	0,055
4	0,085
5	0,032
6	0,040
7	0,033
8	0,035
9	0,055
10	0,036
N=10	
Média	0,045
DP	0,016
EPM	0,005

GRUPO CONTROLE

Ratos	MPO
1	0,136
2	0,072
3	0,070
4	0,112
5	0,102
6	0,065
7	0,056
8	0,029
9	0,100
10	0,029
N=10	
Média	0,077
DP	0,035
EPM	0,011

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	MPO
1	0,050
2	0,081
3	0,036
4	0,060
5	0,086
6	0,059
7	0,056
8	0,075
9	0,040
10	0,090
N=10	
Média	0,063
DP	0,019
EPM	0,006

Anexo I. Valores individuais do escore histológico pancreático nos grupos estudados.

GRUPO SHAM

Ratos	Escore
1	1,5
2	1
3	3,5
4	2,5
5	1
6	2
7	1
8	1
9	2
10	2
N=10	
Mediana	1,75
DP	0,82

GRUPO CONTROLE

Ratos	Escore
1	4,5
2	6,5
3	4,5
4	12
5	3,5
6	6,5
7	8,5
8	7
9	4
10	3,5
N=10	
Mediana	5,5
DP	2,6

GRUPO PENTOXIFILINA

Ratos	Soma
E6	3,5
E27	3
E28	4,5
E29	3
E30	3
E31	3
E32	3
E33	5,5
E36	4
E37	3
N=10	
Mediana	3
DP	0,8

8. REFERÊNCIAS

1. Hussein AM, Abd-Elkhabir A, Abozahra A, Baiomy A, Ashamallah SA, Sheashaa HA, Sobh MA. Pancreatic injury secondary to renal ischemia/reperfusion injury: Possible role of oxidative stress. *Physiol Res*. 2014; 63(1):47-55.
2. Neeff HP, Sommer O, Meyer S, Tinelli A, Scholtes M, Hopt UT, Drognitz O, von Dobschuetz E. Blood modulates the kinetics of reactive oxygen release in pancreatic ischemia-reperfusion injury. *Pancreas*. 2012; 41(7):1105-1111.
3. Maglione M, Ploeg RJ, Friend PJ. Donor risk factors, retrieval technique, preservation and ischemia/reperfusion injury in pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013; 18(1):83-88.
4. Nadalin S, Girotti P, Konigsrainer A. Risk factors for the management of graft pancreatitis. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013; 18(1):89-96
5. Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HG. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Pancreatology*. 2001; 1(1):63-68.
6. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000; 190(2):117-125.
7. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: Current concepts. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30(4):343-356.
8. Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet*. 2003; 361(9367):1447–1455.
9. Munoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceno J, Collado JA, Munoz-Castaneda JR, Ortega R, Cruz A, Tunez I, Montilla P, Pera C, Muntane J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia-reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res*. 2006; 40(3):195-203.
10. Weinbroum AA. Methylene blue attenuates pancreas ischemia-reperfusion (IR) induced lung injury: a dose response study. *J Gastrointest Surg*. 2009; 13(9):1683-1691.
11. Drognitz O, Benz S, Pfeffer F, Fischer C, Makowiec F, Schareck W, Hopt UT. Long-term follow-up of 78 simultaneous pancreas-kidney transplant at a single-center institution in Europe. *Transplantation*. 2004; 78(12):1802-1808.
12. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowics P, Dembinski M, Cieszkowski J, Pawlik WW, Tomaszewska R, Konturek SJ, Konturek PC. Effect of ischemic preconditioning on pancreatic regeneration and pancreatic expression of vascular endothelial growth factor and platelet. *Pharmacol*. 2006; 57(1):39-58.

13. Maglione M, Hermann M, Hengster P, Schneeberger S, Mark W, Obrist P, Margreiter R, Brandacher G. A novel technique for heterotopic vascularized pancreas transplantation in mice to assess ischemia reperfusion injury and graft pancreatitis. *Surgery*. 2007; 141(5):682-689.
14. Pegg D. Organ preservation. *Surg Clin North Am*. 1986; 66(3):617-632.
15. Flaishon R, Szold O, Weinbroum A. Acute lung injury following pancreas ischaemia-reperfusion: role of xanthine oxidase. *Eur J Clin Invest*. 2006; 36(11):831-837.
16. Abdin AA, El-Hamid MA, El-Seould SH, Balaha MF. Effect of pentoxifylline and/or alpha acid on experimentally induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol*. 2010; 643(2-3):289-296.
17. Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Stachura J, Tomaszewska R, Konturek SJ, Sendur R, Dembinski M, Pawlik WW. Pancreatic damage and regeneration in the course of ischemia-reperfusion induced pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2001; 52(2):221-235.
18. Gea-Sorlí S, Guillamat R, Serrano-Mollar A, Closa D. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. *J Pathol*. 2011; 223(3):417-424.
19. Guzel A, Kanter M, Guzel A, Pergel A, Erboga M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion. *J Mol Histol*. 2012; 43(3):361-369.
20. Dembinski A, Warzecha Z, Konturek SJ, Ceranowicz P, Dembinski M, Pawlik WW, Kusnierz-Calaba B, Naskalski JW. Extract of grapefruit-seed reduces acute pancreatitis induced by ischemia/reperfusion in rats: possible implication of tissue antioxidants. *J Physiol Pharmacol*. 2004; 55(4):811-821.
21. Li ZD, Ma QY, Wang CA. Effect of resveratrol on pancreatic oxygen free radicals in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(1):137-140.
22. Lo HA, Sun LN, Chen CF, Wang D, Zhang HP. Ischemia-reperfusion of the pancreas induced hyperresponsiveness of the airways in rats. *Transplant Proc*. 2009; 41(1):63-66.
23. Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Tomaszewska R, Dembiński M, Pabiańczyk M, Stachura J, Konturek SJ. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. *Eur J Pharmacol*. 2003;

- 473(2-3):207-216.
24. Nikeghbalian S, Mardani P, Mansoorian MR, Salahi H, Bahador A, Geramizadeh B, Kakaei F, Johari HG, Malekhosseini SA. The Effect of ischemic preconditioning of the pancreas on severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis after a long period of ischemia in the rat. *Transplant Proc.* 2009; 41(7):2743-2746.
 25. Chen CF, Chen HT, Wang D, Li JP, Fong Y. Restrictive ventilatory insufficiency and lung injury induced by ischemia/reperfusion of the pancreas in rats. *Transplant Proc.* 2008; 40(7):2185-2187.
 26. Gea-Sorli S, Guillamat R, Serrano-Mollar A, Closa D. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. *J Pathol.* 2011; 223(3):417-424.
 27. Gómez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Viña J, Sastre J. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002; 1(4):393-403.
 28. Zhou X, Li Y, Ding J, Wang L, Wang R, Zhou B, Gu J, Sun X, Zhou Z. Down-regulation of tumor necrosis factor-associated factor 6 is associated with progression of acute pancreatitis complicating lung injury in mice. *Tohoku J Exp Med.* 2009; 217(4):279-285.
 29. Makhija R, Kingsnorth NA. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9(4):401-410.
 30. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg.* 1998; 175(1):76-83.
 31. Apostolidis D, Ntinis A, Kardassis D, Koulouris N, Thomareis O, Karayannopoulou G, Vrochides D. Nimesulide may be more efficient than allopurinol in protecting pancreas from acute ischemia/reperfusion injury in an animal model. *Vasc Endovascular Surg.* 2012; 46(8):654-663.
 32. Hogan AR, Doni M, Molano RD, Ribeiro MM, Szeto A, Cobiauchi L, Zahr-Akrawi E, Molina J, Formoni A, Mendez AJ, Ricordi C, Pastori RL, Pileggi A. Beneficial effects of ischemic preconditioning on pancreas cold preservation. *Cell Transplant.* 2012; 21(7):1349-1360.
 33. Keck T, Werner J, Schneider L, Gebhard MM, Klar E. Characterization of ischemia/reperfusion injury after pancreas transplantation and reduction by

- application of monoclonal antibodies against ICAM-1 in the rat. *Surgery*. 2003; 134(1):63-71.
34. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000; 190(2):117-125.
35. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee J, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M. Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res*. 1997;71(2):127-136.
36. Drognitz O, Michel P, Koczan D, Neeff H, Mikami Y, Obermaier R, Thiesen HJ, Hopt UT, Loebler M. Characterization of ischemia-reperfusion induced gene expression in experimental pancreas transplantation. *Transplantation*. 2006; 81(10):1428-1434.
37. Woeste G, Wullstein C, Meyer S, Usadel K, Hopt U, Bechstein W, von Dobschuetz E. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation*. 2008; 86(7):961-967.
38. Drognitz O, Obermaier R, Dobschuetz E, Pisarski P, Neeff H. Pancreas transplantation and ischemia-reperfusion injury: current considerations. *Pancreas*. 2009; 38(2):226-227.
39. Weinbroum A. Mannitol prevents acute lung injury after pancreas ischemia-reperfusion: a dose-response, ex vivo study. *Lung*. 2009; 187(4):215-224.
40. von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK, Hopt UT, Pannen BH. Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia-reperfusion in rats. *Pancreas*. 2008; 36(4):377-384.
41. Hackert T, Werner J, Uhl W, Gebhard M, Buchler M, Schmidt J. Reduction of ischemia-reperfusion injury by antithrombin III after experimental pancreas transplantation. *Am J Surg*. 2005; 189(1):92-97.
42. Marzi I, Maier M, Herzog C, Bauer M. Influence of pentoxifylline on liver microcirculation and leukocyte adhesion after hemorrhagic shock in rat. *J Trauma*. 1996; 40(1):90-96.
43. Coimbra R, Melbostad H, Hoyt DB. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline. *J Trauma*. 2004; 56(2):442-449.

44. Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the regulation of TNF- α production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*. 2008; 63(3):321-328.
45. Matheus AS, Coelho AM, Sampietre S, Jukemura J, Patzina RA, Cunha JE, Machado MC. Do the effects of pentoxifylline on the inflammatory process and pancreatic infection justify its use in acute pancreatitis? *Pancreatology*. 2009; 9(5):687-693.
46. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery*. 1991; 110(2):192-198.
47. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF, Rossi B, Gugenheim J. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB*. 2007; 9(2):112-119.
48. Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012; 385(5): 465-471.
49. Yang Q, Zheng FP, Zhan YS, Tao J, Tan SW, Liu HL, Wu B. Tumor necrosis factor- α mediates JNK activation response to intestinal ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(30):4925-4934.
50. Genoves P, Garcia D, Cejalvo D, Martin A, Zaragoza C, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH, Lloris-Carsi JM. Pentoxifylline in liver ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*. 2014; 27(2): 114-124.
51. Marqui CE, Silva HC, Ferez D, Cavassani SS, Moraes JB, Silva DA, Simoes RS, Lopes CA, Taha MP, Oliveira-Junior IS. Pretreatment with pentoxifylline attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011; 26(6):438-444.
52. Ribeiro EA, Poli-de-Figueiredo LF, Vincenzi R, Galvão FH, Margarido N, Rocha e Silva M, Cruz RJ. Intraportal versus systemic pentoxifylline infusion after normothermic liver ischemia: effects on regional blood flow redistribution and hepatic ischemia-reperfusion injury. *HPB Surg*. 2013; 1-6.
53. Jamieson A, Pruitt K, Caldwell R. (1969). An improved amylase assay. *J Dent Res*. 1969; 48(3):483.

-
54. Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Pacher P, Szabo C. Resistance to acute septic peritonitis in poly (ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. 2002; 17(4):286-292.
 55. Goldblum S, Wu K, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985; 59(6):1978-1985.
 56. Warren JS, Yabroff KR, Mandel DM, Johnson KJ, Ward PA. Role of O₂ – in the neutrophil recruitment into site of dermal and pulmonary vasculitis. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(2):163-172.
 57. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg*. 1992; 215(1):44-56.
 58. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. 1^o ed. Londres, Chapman & Hall, 1991.
 59. Numro BH. *Statistical methods for health care research*. 4^o ed. Portland, Lippincott, 2001.
 60. Su RH, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB*. 2006; 8(4):264-286.
 61. Junior RF, Kubrusly MS, Bellodi-Privato M, Molan NA, Machado MC, D'Albuquerque LA. Beneficial effects of n-acetyl cysteine on pancreas and kidney following experimental pancreatic ischemia-reperfusion in rats. *Clinics*. 2010; 65(3):311-316.
 62. Rocha-Santos V, Ferro OC, Pantanali CA, Seixas MP, Pecora RA, Pinheiro RS, Claro LC, Abdo EE, Chaib E, D'Albuquerque LA. The effects of profound hypothermia on pancreas ischemic injury: a new experimental model. *Pancreas*. 2014; 43(6):946-950.
 63. Chrysikos DT, Sergentanis TN, Zagouri F, Psaltopoulou T, Flessas I, Agrogiannis G, Alexakis N, Bramis I, Patsouri EE, Patsouris ES, Korontzi M, Katsarou A, Zografos GC, Papalois AE. The effect of U-74389G on pancreas ischemia-reperfusion injury in a swine model. *J Surg Res*. 2014; 187(2):450-457.
 64. Lunsford KE, Baird BJ, Sempowski GD, Cardona DM, Li Z, Weinhold KJ, Sudan DL, Brennan TV. Upregulation of IL1B, IL-6 and CCL-2 by a novel mouse model of pancreatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2013; 95(8):1000-1007.

-
65. Warzecha Z, Dembiski A, Ceranowicz P, Dembiski M, Sendur R, Cieszkowski J, Sendur P, Tomaszewska R. Heparin inhibits protective effect of ischemic preconditioning in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63(4):355-365.
66. Schanaider A, de Carvalho TP, de Oliveira CS, Renteria JM, Eleutherio EC, Castelo-Branco MT, Madi K, Baetas da Cruz W, de Souza HS. Ischemia-reperfusion rat model of acute pancreatitis: protein carbonyl as a putative early biomarker of pancreatic injury. *ClinExp Med.* 2014; [Epubaheadofprint].
67. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline: A review of its pharmaco-dynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987; 34(1):50-97.
68. Mollitt DL, Poulos ND. The role of pentoxifylline in endotoxin induced alterations of red blood cell deformability and whole blood viscosity in the neonate. *J Pediatr Surg.* 1991; 26(5):572-574.
69. Camara-Lemarroy CR, Gizman-de laGarza FJ, Alarcon-Galvan G, Cordero-Perez P, Munoz-Espinosa LE, Fernandez-Garza NE. Effects of thalidomide and pentoxifylline over local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion. *Transplant Proc.* 2010; 42(5):1624-1626.
70. Seifi B, Kadkhodaei M, Delavari F, Mikaeili A, Shams S, Ostad SN. Pretreatment with pentoxifylline and N-acetylcysteine in liver ischemia reperfusion-induced renal injury. *Ren Fail.* 2012; 34(5):610-615.
71. Brasileiro JL, Inoye CM, Aydos RD, Silva IS, Falcão GR, Marks G, Pereira DM. Ischemia and reperfusion of rat small intestine using pentoxifylline and prostaglandin E1. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(11):767-773
72. Gerlach UA, Atanasov G, Wallenta L, Polenz D, Reutzel-Selke A, Kloepfel M, Jurisch A, Marksteiner M, Loddenkemper C, Neuhaus P, Sawitzki B, Pascher A. Short-term TNF-alpha inhibition reduces short-term and long-term inflammatory changes post-ischemia/reperfusion in rat intestinal transplantation. *Transplantation.* 2014; 97(7):732-739.
73. Rocha-Santos V. Isquemia-reperfusão hepática em ratos: efeitos da administração endovenosa da pentoxifilina associada à solução salina hipertônica a 7,5%. 2010. 90f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.
74. 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):42-49.
75. Yuan CH, Liu Y, Cheng YF, Zhao N, Li GC, Liang J, He SG. Protective effects of L-arginine on reperfusion injury after pancreaticoduodenal transplantation in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2004; 3(3): 349-354.
76. Benz S, Obermaier R, Wiessner R, Breitenbuch PV, Burska D, Weber H, Schnabel R, Mayer J, Pfeffer F, Nizze H, Hopt UT. Effect of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the pancreas. *J Surg Res*. 2002; 106(1):46-53.
77. Khoury W, Namnesnikov M, Fedorov D, Abu-Ghazala S, Weinbroum A. Mannitol attenuates kidney damage induced by xanthine-oxidase-associated pancreas ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 2010; 160(1):163-168.
78. Aslan A, Karagüzel G, Celik M, Uysal N, Yücel G, Melikoglu M. Pentoxifylline contributes to the hepatic cytoprotective process in rats undergoing hepatic ischemia and reperfusion injury. *Eur Surg Res*. 2001; 33(4):285-290.
79. Kaptanoglu L, Kapan M, Kapan S, Goksoy E, Oktar H. Effects of nimodipine and pentoxifylline in prevention of hepatic ischemic damage in rats at normal and hypothermic conditions. *Eur J Pharmacol*. 2008; 587(1-3):253-256.
80. Coelho AM, Kunitake TA, Machado MC, Martins JO, Patzina RA, D'Albuquerque LA, Jukemura J. Is there a therapeutic window for pentoxifylline after the onset of acute pancreatitis? *Acta Cir Bras*. 2012; 27(7):487-493.
81. Coelho AM, Jukemura J, Sampietre SN, Martins JO, Molan NA, Patzina RA, Lindkvist B, Jancar S, Cunha JE, D'Albuquerque LA, Machado MC. Mechanisms of the beneficial effect of hypertonic saline solution in acute pancreatitis. *Shock*. 2010; 34(5):502-507.
82. Camara-Lemarroy. Remote ischemic preconditioning as treatment for non-ischemic gastrointestinal disorders: beyond ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(13):3572-3581.
83. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiology implications. *Gut*. 2000; 47(4):546-552.
84. Kazmierczak SC, Van Lente F, Hodges ED. Diagnostic and prognostic utility of phospholipase A activity in patients with acute pancreatitis: comparison with amylase and lipase. *Clin Chem*. 1991; 37(3):356-360.
85. Tenner S, Baillie J, DeWitt J, Vege SS. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2013;

- 108(9):1400-1415.
86. Teruya R, Fagundes DJ, Oshima CT, Brasileiro JL, Marks G, Ynouye CM, Simoes MJ. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2008; 23(1):29-35.
87. Vardanian AJ, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review. *Mol Med*. 2008;(5-6):337-345.
88. Sener G, Akgün U, Satiroğlu H, Topaloğlu U, Keyer-Uysal M. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001; 15(1):19-22.
89. Neseek-Adam V, Vnuk D, Rasic Z, Rumenjak V, Kos J, Krstonijevic Z. Comparison of the effects of low intra-abdominal pressure and pentoxifylline on oxidative stress during CO₂ pneumoperitoneum in rabbits. *Eur Surg Res*. 2009; 43(4):330-337.
90. Müller JM, Vollmar B, Menger MD. Pentoxifylline reduces venular leukocyte adherence ('reflow paradox') but not microvascular 'no reflow' in hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 1997; 71(1):1-6.
91. Ciuffetti G, Mercuri M, Ott C, Lombardini R, Paltriccia R, Lupattelli G. Use of pentoxifylline as an inhibitor of free radical generation in peripheral vascular disease. Results of a double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991; 41(6):511-515.
92. Flynn WJ, Cryer HG, Garrison RN. Pentoxifylline restores intestinal microvascular blood flow during resuscitated hemorrhagic shock. *Surgery*. 1991; 110(2):350-356.
93. Machado MC, Coelho AM, Martins JO, Sampietre SN, Molan NA, Patzina RA, Machado MA, Jancar S. CO₂ abdominal insufflation decreases local and systemic inflammatory response in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2010; 39(2):175-181.
94. Kim K, Li Y, Jin G, Chong W, Liu B, Lu J, Lee K, Demoya M, Velmahos GC, Alam HB. Effect of valproic acid on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion. *Resuscitation*. 2012; 83(2):243-248.
95. Demir T, Ulas F, Ozercan I, Ilhan N, Celiker U, Yasar MA. Protective effects of pentoxifylline in retinal ischemia/reperfusion injury. *Ophthalmologica*. 2003; 217(5):337-341.