PRISCILA CASARIN GARLA

Repercussão do uso parenteral prévio de emulsão lipídica de óleo de peixe sob a resposta inflamatória sistêmica e sobrevida em modelo experimental de pancreatite aguda.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dan Linetzky Waitzberg

**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

Garla, Priscila Casarin

Repercussão do uso parenteral prévio de emulsão lipídica de óleo de peixe sob a resposta inflamatória sistêmica e sobrevida em modelo experimental de pancreatite aguda / Priscila Casarin Garla. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Ácidos graxos ômega-3 2. Ácidos graxos ômega-3/farmacologia 3.Óleos de peixe 4.Citocinas 5.Pancreatite necrosante aguda 6.Ratos 7.Nutrição parenteral

USP/FM/DBD-179/15

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo – Metanutri do Laboratório de Investigação Médica – LIM 35 da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Auxílio Pesquisa: Fapesp nº 2012/02071-7

Fresenius Kabi do Brasil

Bolsa Mestrado: Fapesp nº 2012/1369-1

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pela fé que me mantém viva e fiel à carreira de nutricionista e pesquisadora científica.

Aos meus avôs, em especial Rubens Casarin e Aparecida Giacomini Casarin (*in memoriam*), que dignamente me apresentaram à importância da família, ao caminho da honestidade e à persistência para realizar os meus sonhos.

Aos meus pais Antônio Roberto Garla e Sonia Casarin Garla pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos e ser uma vencedora na vida.
Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

À minha família que soube compreender a minha ausência em muitos momentos de alegria e tristeza desde o momento que ingressei na carreira acadêmica até a conclusão do Mestrado. A minha tia Sueli Maria Casarin por me acolher em sua casa como uma filha, com amor e paciência diários a mim dedicados. Ao meu tio Prof. Dr. Rui Casarin, o primeiro membro da família Casarin a se tornar Professor Doutor, e a me mostrar importância da ambição na carreira profissional.

Ao meu noivo e futuro marido, Magdy El-gohary, fruto do destino, um presente de Deus para mim! Serei sempre grata pela sua ajuda na finalização deste trabalho e por ser uma fonte de apoio e encorajamento para os próximos desafios da minha carreira profissional. Sou verdadeiramente grata por ter você em minha vida.

“To my fiancée and future husband, Magdy El-gohary, my destiny, a gift of God to me! I will always be grateful for your assistance in helping me to conclude this study and being a source of support and encouragement to the next challenges of my professional carrer. I am truly thankful for having you in my life”.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Dan L. Waitzberg, para quem não há agradecimentos que cheguem. Minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; minha admiração pela sua serenidade em aperfeiçoar o perfil profissional de seus alunos e pelo seu dom no ensino da Ciência.

"Se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton, Fevereiro de 1676

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros votos de agradecimento,

Ao amigo Ricardo Garib, o meu apreço pela parceria no desenvolvimento deste trabalho. Juntos nesta longa jornada, partilhamos muitos momentos de alegrias e conquistas, enfrentamos derrotas e vencemos obstáculos. Você foi o meu companheiro em muitas madrugadas e finais de semana que deixamos de passar com nossas famílias e amigos para executarmos experimentos científicos no laboratório, uma distinta ajuda que foi fundamental para concretização desta pesquisa. Obrigada Ricardo pelos valiosos conselhos à minha vida profissional e pessoal. Que o meu sucesso seja o seu sucesso.

O meu reconhecimento e agradecimento a bióloga Raquel Suzana Torrinhas de Mattos, pela enorme contribuição em minha carreira profissional, por sua incansável ajuda no aperfeiçoamento teórico e científico deste estudo.

Às nutricionistas Maria Carolina Gonçalves Dias e Lidiane Catalani, meu agradecimento pela oportunidade de participar da Equipe de Terapia Nutricional do Hospital das Clínicas de São Paulo – EMTN HC, que contemplou importantes contribuições a minha carreira de nutricionista. À Carolina Dias, minha eterna gratidão pela indicação de meu trabalho ao Prof. Dan L. Waitzberg.

Aos ilustres membros do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (Metanutri) pelo compartilhamento diário de conhecimentos científicos, em especial às nutricionistas Priscila Sala, Natália Lima Rodrigues e Rita de Cássia Borges de Castro, pela sincera amizade e paciência em meus momentos de estresse.

Ao amigo e funcionário do Metanutri, Francisco Balbino, que sempre trabalhou com zelo para manter adequado o ambiente de cirurgia experimental no LIM 35; e pelos conselhos de vida que me acalmaram quando a vontade de desistir era muito tentadora.

À nutricionista Letícia Campos, que me ensinou com profissionalismo e paciência a técnica de cateterização venosa central, e pelas dicas valiosas no manejo de animais de laboratório.

À equipe do Laboratório de Cirurgia e Transplante do Fígado (LIM 37) da FMUSP, ao Professor Dr. Marcel Campos Machado, o meu agradecimento pelos conselhos científicos que abrilhantaram esta pesquisa. Às farmacêuticas Ana Maria Coelho, Nilza e à bióloga Sandra Sampietre por me ensinarem pacientemente a técnica experimental para indução de pancreatite aguda em ratos e por viabilizarem a dosagem plasmática e tecidual de marcadores de gravidade desta doença. Aos queridos colegas e auxiliares do LIM 37, Dona Maria Aparecida e Zú por me acolherem sempre com humildade, simpatia e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

À patologista Dra. Rosely Antunes Patzina e ao técnico de laboratório Célio Nasário da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela ética e profissionalismo na análise histopatológica das amostras de pâncreas do estudo.

Ao professor Dr. Philip Calder, pela oportunidade que me foi concedida de realizar as análises de mediadores lipídicos pulmonares no Laboratório de Imunologia da Universidade de Southampton no Reino Unido e pela doação de kits ELISA ao projeto, necessários para a dosagem dos mediadores. À nutricionista do Departamento de Pesquisa de Southampton, Elizabeth Miles, pelo ensinamento da metodologia e total apoio na execução da análise.

Ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB de Campinas, pelo fornecimento de ratos isogênicos, indispensáveis para o desenvolvimento deste projeto de estudo. Em particular, às funcionárias Érica e Regina pela dedicação e comprometimento com a parceria do LIM 35.

Aos motoristas e funcionários do Departamento de Transporte da FMUSP, que sempre estiveram disponíveis para executar com responsabilidade o transporte de ratos do CEMIB - Unicamp.

À diretoria dos LIMs - Direxlim da FMUSP, em especial à chefe de seção Joana Maziero Bernardo, pela crucial ajuda na compra de cateteres de infusão intravenosa durante os seis anos de desenvolvimento deste estudo e ao serviço de laboratório, senhor Antônio Carlos da Silva, pela simpatia e disponibilidade em ajudar os pesquisadores do LIM 35.

À empresa Farmoterápica, em destaque aos farmacêuticos Dr. Michel Kfoury e Dra. Carmem Maldonado por honrar sempre com responsabilidade a parceria com o LIM-35 para o fornecimento de bolsas parenterais manipuladas para ratos.

À empresa Baxter® pelo contrato de comodato de bombas de infusão, que foram imprescindíveis para a execução desta pesquisa.

À Fresenius-Kabi® pela fiel parceria nos estudos experimentais do LIM 35, em especial aos farmacêuticos Dr. Ewald Schlotzer pela amizade e aconselhamento científico, Dr. Mauro Pimentel e Dra. Soraia Torres pelo fornecimento de farmaconutrientes Omegaven® e Dipeptiven®, conforme a demanda do projeto de pesquisa.

À transportadora World Courier, em particular à funcionária Isadora Goncal Soares, pelo profissionalismo ao me ensinar todos os trâmites necessários para adequada exportação de amostras biológicas para o Reino Unido.

À farmacêutica Margareth Braga da empresa Gênesis, pela competência em desenvolver análises de citocinas séricas de nosso estudo.

À nutricionista Livia Samara Rodrigues, pelo árduo trabalho na execução de análises de cromatografia plasmática de ácidos graxos ômega-3.

Aos estaticistas João Ítalo França, Márcio Augusto Diniz e Lucas Petri Damiani pelo desempenho de numerosas análises estatísticas dos dados deste estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa – Fapesp, pela concessão da Bolsa de Auxílio Regular à Pesquisa e de minha Bolsa Mestrado, essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pelo incentivo e apoio financeiro ao estudante brasileiro.

Aos professores Dr. José Jukemura, Heraldo Possolo de Souza e André Luis Montagnini, o meu muito obrigada pelo aceite em compor a banca de minha prova de qualificação e pelo aconselhamento científico para interpretar os dados deste estudo.

Aos meus queridos pupilos, nutricionista Alweyd Tesser e estudante de graduação Felipe Gutierrez, por serem meus fieis companheiros na etapa final desta pesquisa e por se tornarem, com destaque, os pesquisadores sucessores da Equipe de Cirurgia Experimental do Metanutri. Ao nutricionista Ronaldo Oliveira pela demonstração de carinho e admiração ao trabalho realizado no Laboratório, principalmente ao grupo de cirurgia experimental. A vocês, desejo que continuem unidos seguindo o caminho da lealdade e serenidade para alcançarem seus objetivos na longa jornada da vida.

Às pessoas que me criticaram e desconfiaram de meu potencial, pelo incentivo de provar que estavam todos errados.

Àqueles não lembrados ou citados, me perdoem a injustiça do esquecimento.

*“... é preciso ter força
É preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo a marca Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria*

*Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida...”*

Milton Nascimento

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: 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. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Farmaconutrição: Nutrientes com capacidade de modular a resposta imunológica	3
1.2 Ácidos graxos ômega-3.....	3
1.3 Emulsão Lipídica de Óleo de Peixe	5
1.4 Pancreatite Aguda	6
1.5 Influência de EL de OP na Pancreatite Aguda	8
2 RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	13
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 MÉTODOS	21
4.1 Local	21
4.2 Aspectos Éticos	21
4.3 Delineamento Experimental	22
4.4 Procedimentos gerais	23
4.4.1 Período de adaptação	23
4.4.2 Animais de experimentação	23
4.4.3 Cateterização do Sistema Venoso Central (CVC)	23
4.4.3.1 Descrição da técnica de cateterização venosa central.....	24
4.4.4 Infusão parenteral	25
4.4.5 Indução de Pancreatite Aguda	27
4.5 Procedimentos específicos da Fase 1.....	28
4.5.1 Citocinas Séricas.....	28

4.5.2 Amilase sérica	28
4.5.3 TNF- α no líquido ascítico	29
4.5.4 Proteínas de Choque Térmico (HSP) 70 e 90	29
4.5.5 Análise de peroxidação lipídica	30
4.5.6 Determinação de Ácidos Graxos ômega-3 EPA e DHA	30
4.5.7 Histopatologia Pancreática.....	31
4.5.8 Análise de Medidores Lipídicos Pulmonares.....	31
4.6 Procedimentos específicos da Fase 2.....	32
4.7 Análise Estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Considerações gerais	37
5.2 Dados gerais	38
5.3 Resultados da Fase 1.....	39
5.3.1 Citocinas.....	39
5.3.2 TNF- α no líquido ascítico	47
5.3.3 Amilase sérica	47
5.3.4 HSP 70 e 90 Pulmonar e Hepática.....	48
5.3.5 Determinação de MDA	54
5.3.6 Determinação de EPA e DHA	55
5.3.7 Histologia do Pâncreas.....	56
5.3.8 Medidores Lipídicos	59
5.4 Resultados da Fase 2.....	62
5.4.1 Sobrevida	62
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	77
8 ANEXOS	81
8.1 ANEXO A – Aprovação CAPPesq	81
8.2 ANEXO B – Protocolo utilizado para análise da concentração sérica de citocinas por plataforma Luminex.....	82
8.3 ANEXO C – Critério de Schmidt	83
9 REFERÊNCIAS.....	87
10 APÊNDICES	
10.1 APÊNDICE A - Contemplação da Pesquisa – Bolsa Internacional de Estágio em Pesquisa – BEPE nº 2013/25796-2	
10.2 APÊNDICE B - apresentação nacional e internacional do estudo	

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AG n-3	Ácido Graxo Ômega-3
AG n-6	Ácido Graxo Ômega-6
AP	<i>Acute Pancreatitis</i>
COX-2	ciclooxigenase 2
CT	Grupo Controle
CVC	Cateterização Venosa Central
DHA	Ácido graxo Docosaexaenóico
EL	Emulsão Lipídica
EPA	Ácido graxo Eicosapentaenóico
ERCP	Colangiopancreatografia Retrógrada
FO	<i>Fish Oil</i>
FOLE	<i>Fish Oil Lipid Emulsion</i>
GSH-PX	Glutathione Peroxidase
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> ; proteína de choque térmico
IFN- γ	Interferon – gama
IKB	proteína quinase
IL	Interleucina
LE	<i>Lipid Emulsion</i>
LTB4	Leucotrieno B4
LTB5	Leucotrieno B5
MDA	Malonaldeído
<i>n-3 FA</i>	<i>n-3 Fatty Acids</i>
NF-KB	Fator nuclear Kappa-B
NP	Nutrição Parenteral
OP	Óleo de Peixe
PA	Pancreatite Aguda
PCR	Proteína C Reativa

PGE2	Prostaglandina E2
PPO	Pancreatite Pós-Operatória
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOD	Superóxido Dismutase
SS	Solução Salina
TBARS	Ácidos Tiobarbitúrios
TCL	Triglicérides de Cadeia Longa
TCM	Triglicérides de Cadeia Média
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alpha
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigação Médica
UNICAMP	Universidade de Campinas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da emulsão lipídica de óleo de peixe Omegaven® 10% - Fresenius-Kabi: 26
Tabela 2	Peso corpóreo (g) de ratos <i>Lewis</i> antes e após a infusão parenteral de diferentes soluções. 38
Tabela 3	Expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental 49
Tabela 4	Expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental 50
Tabela 5	Expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental 50
Tabela 6	Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções..... 51
Tabela 7	Cinética dos tempos de 2 e 12 horas dos níveis ($\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) de MDA em fragmento hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções..... 55
Tabela 8	Histologia de tecido pancreático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental..... 56
Tabela 9	Histologia de tecido pancreático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental..... 57

Tabela 10	Cinética de 2 e 12 horas da histologia de tecido pancreático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados após indução de pancreatite aguda experimental.....	57
Tabela 11	Relação (mediana) do tempo de evento de morte de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram observados até sete dias após indução de pancreatite aguda experimental	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do delineamento experimental das fases 1 e 2 do estudo:.....	22
Figura 2	Representação ilustrativa das quatro principais fases do procedimento cirúrgico de cateterização venosa central (CVC) em ratos	25
Figura 3	Aspecto do arco duodenal e do pâncreas após a indução da pancreatite, com presença de hiperemia e edema do tecido pancreático, o duto biliar cateterizado e ocluído junto ao hilo hepático e o arco duodenal reparado	27
Figura 4	Variação de peso corpóreo (g) de ratos <i>Lewis</i> antes e após a infusão parenteral de diferentes soluções.....	38
Figura 5	Níveis séricos (pg/ml) de IL-1 β de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	39
Figura 6	Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-1 β de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	40
Figura 7	Níveis séricos (pg/ml) de IL-2 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	41
Figura 8	Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-2 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	41
Figura 9	Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-4 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	42
Figura 10	Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-6 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	43

Figura 11	Níveis séricos (pg/ml) de IL-10 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	44
Figura 12	Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-10 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	44
Figura 13	Níveis séricos (pg/ml) de TNF- α de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	45
Figura 14	Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-10 de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	46
Figura 15	Relação (pg/ml) de IL-6/IL-10 na cinética de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental	46
Figura 16	Níveis (U/L) de amilase sérica de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	47
Figura 17	Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 em fragmentos de tecido pulmonar de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções	52
Figura 18	Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 90 em fragmentos de tecido pulmonar de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções	52
Figura 19	Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 em fragmentos de tecido hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções	53
Figura 20	Cinética de 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 90 em fragmentos de tecido hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam infusão parenteral de diferentes soluções	53

Figura 21	Níveis ($\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) de MDA no tecido hepático de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	54
Figura 22	Concentração de ácido graxo ômega-3 DHA (22:6 n-3) no plasma de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental.....	55
Figura 23	Cinética dos tempos de 2 e 12 horas do escore (expansão focal e difusa) de edema da histologia de tecido pancreático de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental.....	58
Figura 24	Cinética dos tempos de 2 e 12 horas do escore (focos) de necrose gordurosa da histologia de tecido pancreático de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental	59
Figura 25	Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de leucotrieno - LTB ₄ no tecido pulmonar de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental....	60
Figura 26	Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de PGE ₂ no tecido pulmonar de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental.....	60
Figura 27	Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de tromboxano – TXB ₂ no tecido pulmonar de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental	61
Figura 28	Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de lipoxina – LPX ₄ no tecido pulmonar de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Nomenclatura dos grupos experimentais que compuseram a Fase 1 do estudo 37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Sobrevida (tempo) de ratos <i>Lewis</i> que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções, foram submetidos à indução de pancreatite aguda experimental e mantidos sob observação por um período de sete dias após pancreatite.	62

RESUMO

Garla PC. *Repercussão do uso parenteral prévio de emulsão lipídica de óleo de peixe sob a resposta inflamatória sistêmica e sobrevida em modelo experimental de pancreatite aguda* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: A infusão parenteral de emulsão lipídica (EL) de óleo de peixe (OP), rica em ácidos graxos ômega-3 (AG n-3), está associada à diminuição do perfil de mediadores pró-inflamatórios em estudos experimentais e clínicos. AG n-3 se incorporam em poucas horas em membranas celulares e geralmente são administrados após a agressão inflamatória. A pancreatite aguda (PA) experimental é modelo de inflamação, local e sistêmico, bem estabelecido. **Objetivo:** O presente estudo avaliou o efeito da infusão parenteral de EL de OP por curto período, antes da indução de PA, sobre a modulação da resposta inflamatória sistêmica e sobrevida. **Métodos:** Após cateterização do sistema venoso central, ratos isogênicos Lewis receberam infusão parenteral de EL de óleo de peixe ou solução salina durante 48 horas, quando então foram submetidos à pancreatite aguda, pela injeção retrógrada de 0,5 mL de solução de taurocolato de sódio a 3% no duto pancreático. Após indução de PA, nos períodos de 2, 12 e 24 horas, os animais foram sacrificados para coleta de amostras de sangue e de tecidos para dosagem de marcadores inflamatórios e histopatológicos. Paralelamente, 20 animais de cada grupo foram observados até sete dias após indução de PA, para avaliação de sobrevida. **Resultados:** O tratamento com EL de óleo de peixe foi associado com diminuição de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (p=0,0006) e IL-6 (p=0,05), diminuição de IL-4 (p=0,0019) e tendência no aumento de anti-inflamatória IL-10 (p=0,06), após 24 horas de PA; e com aumento da expressão pulmonar e hepática de proteínas de choque térmico HSP 90, 2 e 12 horas após PA, respectivamente. Após infusão de EL de óleo de peixe, não foram encontrados efeitos sobre os níveis de malonaldeído no fígado e na histopatologia do pâncreas, no período de 2 e 12 horas pós pancreatite aguda; e na taxa de sobrevida, em relação aos demais grupos (p>0,05). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a infusão parenteral de EL de OP 48 horas antes da indução de pancreatite aguda experimental parece influenciar favoravelmente a produção de citocinas inflamatórias e HSP90 hepática e pulmonar, sem impactar sobre a histopatologia da lesão pancreática e a taxa de sobrevida.

Descritores: Ácidos graxos ômega-3/farmacologia; Óleos de peixe; Citocinas; Pancreatite necrosante aguda; Ratos; Nutrição parenteral.

SUMMARY

Garla PC. *Impact of prior use of parenteral fish oil lipid emulsion in the systemic inflammatory response and survival in an experimental model of acute pancreatitis* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The parenteral infusion of fish oil (FO) lipid emulsion (LE), rich in omega-3 fatty acids (n-3 FA), is associated with the decrease of pro-inflammatory mediators profile in experimental and clinical studies. N-3 FA are incorporated in a few hours in cell membranes and are generally administered after the inflammatory injury. The experimental acute pancreatitis (AP) is an inflammation, local and systemic well-established model. This study evaluated the effect of parenteral infusion of fish oil LE for a short period before AP induction, on the modulation of systemic inflammatory response and survival. For this, after the central venous catheterization Lewis rats received parenteral infusion of fish oil LE or saline solution for 48 hours, when they were induced to acute pancreatitis by retrograde injection of 0.5 mL of sodium taurocholate at 3% in pancreatic duct. After AP induction, in periods of two, 12 and 24 hours, the animals were sacrificed to collect blood samples and tissues for measurement of inflammatory markers and histopathological. In parallel, 20 animals in each group were observed up to 7 days after induction of AP, for survival analysis. The treatment with fish oil LE was associated with decreased of pro-inflammatory cytokines IL-1 β ($p = 0.0006$) and IL-6 ($p = 0.05$), reduction of IL-4 ($p = 0.0019$) and upward trend of anti-inflammatory IL-10 ($p = 0.06$) after 24 hours of AP; and increased pulmonary and hepatic expression of heat shock proteins HSP 90 two and 12 hours after AP, respectively. After infusion of fish oil LE, there were no effects on malondialdehyde levels in the liver and the pancreas histopathology in the periods of 2 and 12 hours after acute pancreatitis; and survival rate, compared to the other groups ($p > 0.05$). Our results suggest that parenteral infusion of FOLE 48 hours before the induction of experimental acute pancreatitis appears to favorably influence the production of inflammatory cytokines; hepatic and pulmonary HSP90, without impacting on the histopathology of pancreatic injury and the survival rate.

Descriptors: Fatty acids omega-3/pharmacology; Fish oils; Cytokines; Pancreatitis acute necrotizing; Rats; Parenteral nutrition.

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Farmaconutrição: Nutrientes com capacidade de modular a resposta imunológica

Ao se considerar a estreita relação entre nutrição, imunidade e inflamação, o emprego de nutrientes com funções que ultrapassam a de substratos macro e micronutrientes tem sido frequente na prática clínica. Nutrientes específicos são enfeixados no termo farmaconutrição e fazem parte da intervenção nutricional que explora a atividade de alguns nutrientes em atenuar a inflamação e modular o sistema imune¹. Na prática clínica, o uso combinado de terapia nutricional parenteral e farmaconutrientes apontam novas possibilidades de intervenção nutricional para o paciente cirúrgico e crítico, que pode contribuir para modificar o estado nutricional, modular favoravelmente às respostas imunológica e inflamatória, e diminuir complicações infecciosas e tempo de internação hospitalar e em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)^{1,2}.

1.2 Ácidos graxos ômega-3

Dentre os nutrientes capazes de modular a resposta imunológica e inflamatória incluem-se os ácidos graxos ômega-3 (AG n-3), em especial os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)^{1,2}. AG n-3 participam diretamente da resposta do sistema imune ao se incorporarem em fosfolípidos de membranas celulares e competirem como substrato alternativo a ácidos graxos ômega-6 (AG n-6), na síntese de mediadores inflamatórios da família dos eicosanóides, e como interruptores da inflamação, denominados resolvinas^{3,4}. Particularmente, eicosanóides originados de EPA, como prostaglandina E₃ (PGE₃), leucotrieno B₅ (LTB₅) e tromboxano 3 (TBX₃) têm potencial inflamatório significativamente menor que aqueles sintetizados a partir de ácido araquidônico (AA) proveniente de AG n-6, que incluem

prostaglandina E2 (PGE2), leucotrieno B4 (LTB4) e tromboxano 2 (TBX2)^{3,4}. Em mediadores do metabolismo de AG n-3, apresentam efeito com menor potencial inflamatório que os provenientes de AG n-6¹⁻⁴.

Além da capacidade de AG n-3 em competirem com AG n-6 pela produção de eicosanoides e resolvinas, outros mecanismos moduladores de funções imunológicas são também atribuídos aos n-3⁴. Entre eles, encontra-se a modulação de vias de sinalização intracelular que conduzem à ativação de um ou mais fatores de transcrição. Nesse contexto, o fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB) tem especial destaque, por participar da transcrição de mediadores inflamatórios como cicloxigenase 2 (COX-2), e favorecer a expressão de genes pró-inflamatórios como, por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucinas (IL) 1β e 6^{5,6,7}. A este respeito, experimentos *in vitro* verificaram que células estimuladas com endotoxinas (LPS) e posteriormente tratadas com EPA e DHA foram capazes de reduzir significativamente a ativação de NF- κB no citoplasma de monócitos humanos^{8,9,10}.

Adicionalmente, ácidos graxos ômega-3 são capazes de modificar a composição da membrana das células do sistema imunológico e afetar a estrutura de microdomínios de membrana funcionais relacionados ao início e propagação de eventos de sinalização celular, conhecidos como *lipid rafts* (4),(5),(6). Vários receptores imunológicos são encontrados nos *lipid rafts* e a integridade desses domínios de membrana é fundamental para que a sinalização via receptores ocorra^{5,6}.

Graças às suas propriedades anti-inflamatórias, hoje se reconhece que AG n-3 podem prevenir ou retardar o desenvolvimento de doenças inflamatórias e atenuarem os processos inflamatórios já em curso, contribuindo para seu tratamento. Em terapia nutricional, fórmulas enterais e parenterais disponíveis para uso clínico são adicionadas de AG n-3 com o intuito de modular a resposta imune. Atualmente, maior atenção tem sido dada ao fato de que a administração por via parenteral resulta na incorporação mais precoce destes ácidos graxos, em especial EPA e DHA, em membranas celulares do que sua administração por via enteral¹¹. É possível, portanto, que a via

parenteral possa ser uma boa ferramenta para se alcançar modulação da resposta imunológica por AG n-3 em curto período de infusão¹².

1.3 Emulsão Lipídica de Óleo de Peixe

Emulsão lipídica (EL), a base de óleo de peixe (OP), é rica fonte de AG n-3, especialmente EPA e DHA, e encontra-se disponível na prática clínica para infusão endovenosa. A infusão parenteral de EL de OP em pacientes sépticos por 48 horas foi capaz de modificar a composição lipídica da membrana de leucócitos mononucleares, com maior concentração de EPA e DHA, e diminuir a produção sérica de citocinas pró-inflamatórias¹³.

Em pacientes cirúrgicos, a suplementação parenteral de EL de OP parece preservar funções imunológicas e modular favoravelmente a produção pós-operatória de mediadores inflamatórios¹⁴⁻¹⁸. Esses benefícios imunológicos foram acompanhados com menor tempo de internação hospitalar e em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e menores taxas de infecções pós-operatórias quando comparado a infusão parenteral de EL convencional de óleo de soja^{17,18}.

Metanálise de 21 estudos clínicos aleatórios controlados encontrou que a infusão parenteral com EL de OP no pós-operatório de cirurgia digestiva eletiva reduz significativamente a taxa de infecções, disfunção hepática e tempo de internação, porém sem influenciar a mortalidade¹⁹.

Em pacientes cirúrgicos internados em UTI, a infusão de nutrição parenteral (NP) suplementada com EL de OP foi associada a menor tempo de internação na Unidade intensiva, apesar de não diminuir a ocorrência de complicações no pós-operatório²⁰. Metanálise publicada por Manzanares e colaboradores em 2014, verificou que o uso de EL de OP, em pacientes críticos ventilados, foi associado a tendência de redução do tempo de ventilação mecânica (VM) e mortalidade ($p>0,05$), porém sem diminuir complicações infecciosas²¹.

A este respeito, o efeito da nutrição parenteral, suplementada com EL de OP em pacientes críticos sob ventilação mecânica, tem sido recentemente

explorada. Em ensaio aleatório controlado, a suplementação de diferentes fontes de EL em NP foi estudada em 451 pacientes críticos em VM. Comparada com EL à base de óleo de soja e de triglicérides de cadeia média (TCM), a EL de OP apresentou significativamente menor tempo de ventilação mecânica e de internação na UTI²².

Em contrapartida, os resultados da literatura não são totalmente concordes sobre benefícios clínicos da infusão de EL de OP em determinados subgrupos de pacientes. Estudo em pacientes cirúrgicos submetidos à ressecção intestinal por câncer, não encontrou efeito imunomodulador com a suplementação de OP na NP, na dose 0,2g/Kg/dia por 5 dias no pós-operatório, mas sim aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interferon gama (IFN- γ)²³. Com metanálise em pacientes críticos com sepse e trauma grave, a nutrição parenteral suplementada com OP não foi correlacionada com redução do tempo de internação na UTI e com incidência de infecções²⁴.

1.4 Pancreatite Aguda

A pancreatite aguda (PA) é inflamação aguda do pâncreas em resposta a agressões de origem multifatorial, como organismos vivos, processos metabólicos, tóxicos e alterações obstrutivas²⁵. Em sua apresentação clínica, a PA pode evoluir de quadro leve, caracterizado por edema pancreático, até quadros graves com extensa necrose, disfunção múltipla de órgãos e morte. A evolução e o quadro clínico estão diretamente relacionados à extensão da lesão pancreática e à intensidade da resposta inflamatória^{26,27}. A PA leve ocorre em 80 a 90% dos casos e apresenta mortalidade inferior a 1%. Cerca de 10 a 15% dos casos evoluem de forma grave com mortalidade que pode atingir até 20%²⁶.

A resposta inflamatória na PA se caracteriza por processo sistêmico com liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , interleucinas (IL) 1, 6 e 8, entre outros. Esses mediadores inflamatórios, na apresentação grave da doença, estão associados à ocorrência de insuficiência respiratória,

instabilidade hemodinâmica, alteração da permeabilidade vascular e insuficiência renal. Em conjunto, esses distúrbios da homeostase compõem a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e, como resultado final, podem proceder em falência de múltiplos órgãos^{27,28}.

A lesão tecidual na PA se inicia na célula acinar pela ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B) e, posteriormente, pela liberação de mediadores inflamatórios. Sabe-se que a lesão da célula acinar é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos circulantes, e pela ativação da cascata inflamatória²⁷⁻³⁰.

Imediatamente após início da lesão do tecido pancreático, inicia-se a resposta inflamatória sistêmica, com aumento de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, 2, 6, 8, TNF- α e PGE2, que é seguida pela liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, com a finalidade de contrarregular o processo inflamatório. No entanto, o desequilíbrio entre a produção de citocinas, com prevalência de citocinas pró em relação a anti-inflamatórias é frequente em pancreatite. Tal fato estabelece o grau da resposta sistêmica^{29,30}. Já foi demonstrada a relação direta entre mediadores inflamatórios e a gravidade da doença; destarte a dosagem de níveis séricos de mediadores inflamatórios pode ser utilizada como fator prognóstico na PA^{28,29,30}.

A pancreatite pós-operatória (PPO) é resultado indesejável dos avanços da cirurgia moderna. A PPO é classicamente descrita após cirurgia das vias biliares, mas também pode ocorrer após procedimentos ao redor do pâncreas, apontando para uma possível causa traumática^{31,32,33,34}. Ocorre ainda como complicação de procedimentos realizados a distância, como nas correções de hérnias inguinais, cirurgias cardíacas ou de cabeça e pescoço³⁴.

A gravidade do quadro da PPO é de fácil entendimento, pois ao trauma cirúrgico já ocorrido vem somar-se o trauma metabólico adicional, com suas graves consequências. Não há como estabelecer a frequência exata da PPO, pois muitas vezes, seu diagnóstico passa despercebido no pós-operatório complicado, ou é reconhecido apenas através da autópsia^{35,36,37}.

PA aumenta as demandas nutricionais, ao desencadear resposta inflamatória local e sistêmica, que pode resultar em hipermetabolismo e

hipercatabolismo acentuados. Neste sentido, a terapia nutricional adequada e precoce faz parte do tratamento da PA³⁸.

Entre as medidas nutricionais estão a manutenção de jejum oral, alimentação por sonda enteral, localizada principalmente na porção jejunal do intestino, ou terapia nutricional parenteral^{38,39}. Associado a essas condutas, nutrientes com potencial anti-inflamatório e imunológico têm sido considerados com intuito de minimizar a resposta inflamatória sistêmica da PA, o que inclui o uso de ácidos graxos ômega-3.

1.5 Influência de EL de OP na Pancreatite Aguda

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado efeito positivo da infusão parenteral de EL de OP, como fonte de AG n-3, em PA⁴⁰⁻⁴⁶. Experimentalmente, observou-se a redução de produtos da peroxidação lipídica, como tiobarbitúricos (TBARS) e aumento de níveis teciduais de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (GSH-PX), superóxido dismutase (SOD) em lesão de tecido pancreático⁴⁰. Após a infusão endovenosa de apenas 18 mL (1mL/hora) de EL de OP, ratos submetidos à PA grave apresentaram redução significativa da gravidade histopatológica do pâncreas⁴¹.

Seis horas após a indução de PA grave, ratos receberam NP contendo 0,2g/Kg/dia de EL de OP durante dois dias. Os animais apresentaram aumento sérico de IL-10 após 24 horas do início da infusão e melhora das funções renal (avaliada pelo volume urinário) e cardiorrespiratória (avaliada por níveis de PO₂), porém sem alteração significativa da infiltração de leucócitos pulmonares e da mortalidade⁴².

Estudo clínico aleatório avaliou o efeito da infusão parenteral de EL de OP, na dose de 0,2 g/Kg/dia por catorze dias em quarenta e cinco pacientes com PA grave. No 14º dia observou-se melhora dos níveis de linfócitos CD4+, razão CD4+/CD8+ e C3, em relação ao grupo controle com tratamento padrão. Os níveis de proteínas C reativa (PCR) e a pontuação de gravidade pelo escore APACHE II nos 7º e 14º dias no grupo OP foram menores, quando comparados ao grupo controle. No desfecho clínico, o tempo de balanço

hídrico negativo foi menor no grupo tratado com AG n-3 ($3,55 \pm 0,86$ dias) *versus* o grupo controle ($4,61 \pm 1,12$ dias). Além disso, o início da terapia nutricional enteral, prática desejável nesses pacientes, foi significativamente mais precoce no grupo ômega-3 ($3,86 \pm 1,17$ dias) em comparação com o grupo controle ($5,30 \pm 1,61$ dias). No entanto, o tempo de permanência em UTI e mortalidade não apresentou diferença significativa entre os dois grupos. Os autores concluíram que a infusão de EL de OP em pacientes com PA grave pode modular favoravelmente a resposta inflamatória e imunológica, com consequente melhora do desfecho clínico, configurando potencial terapêutico para o tratamento da PA na forma grave⁴³.

O benefício da infusão parenteral de EL de OP, no desfecho clínico, recebe apoio nos achados de outro ensaio clínico aleatório e duplo-cego envolvendo quarenta pacientes com PA, publicado por Wang e colaboradores em 2.008⁴⁴. Nesse estudo, os doentes receberam por cinco dias a dose de 0,15 a 0,2 g/kg/dia de OP contido em uma solução de NP, em relação à NP contendo somente EL à base de óleo de soja. Os autores observaram nos doentes com OP o aumento dos níveis plasmáticos de EPA, diminuição significativa de PCR, melhora da taxa de oxigenação e redução de dias com terapia de substituição renal contínua. Com base nesses achados, autores concluíram que a NP suplementada com EL de OP reduziu a intensidade da resposta inflamatória e que esses efeitos se correlacionaram com aumento plasmático de EPA e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias em PA grave⁴⁴.

Outros pesquisadores buscaram minimizar a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) na fase inicial da pancreatite aguda grave com infusão de OP. Assim, 60 pacientes foram aleatoriamente divididos para receber sete dias de infusão de NP padrão à base de óleo de soja (30) ou NP contendo EL de soja e suplementada com 0,2g/Kg/dia de OP. O grupo suplementado com OP apresentou menor pontuação do escore de gravidade APACHE-II a partir do quarto dia de infusão, menor tempo de reidratação (5,1 vs 8,4 dias) e melhor razão plasmática de IL-10/TNF- α ⁴⁵.

Parte desses ensaios clínicos foi incluída na recente metanálise publicada por Lei e colegas⁴⁶ no ano de 2015. A compilação de oito estudos aleatórios

controlados em pacientes com PA grave mostrou que a suplementação com ácidos graxos ômega-3, por via enteral e parenteral por cinco dias ou até duas semanas, foi efetiva na redução de complicações infecciosas, menor tempo de internação hospitalar comparado com nutrição convencional. No subgrupo de pacientes em uso exclusivo de nutrição parenteral, a suplementação com ômega-3 foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade. Os Estes achados foram reforçados pela metanálise recentemente publicada por Jafari, que estudou o efeito da suplementação parenteral de farmaconutrientes, como ácidos graxos ômega-3 e glutamina, em pacientes graves com pancreatite aguda⁴⁷.

Diante desses achados, torna-se importante destacar que as evidências experimentais e clínicas são favoráveis ao uso de EL de OP como parte da terapia nutricional, usada como fonte de suplementação em pacientes sob vigência da NP. No entanto, não temos conhecimento de estudos clínicos que avaliaram benefícios da infusão intravenosa exclusiva de EL de OP na pancreatite aguda. Em conjunto, poucos estudos investigaram o efeito prévio de ácidos graxos ômega-3 na progressão da pancreatite aguda, considerando a suplementação deste nutriente anterior à agressão pancreática.

Adiciona-se que Sharif e seus colaboradores estudaram experimentalmente a suplementação oral de ácidos graxos ômega-3 quando ministrados anteriormente à indução de pancreatite. Os autores observaram a diminuição de macrófagos infiltrados no pâncreas e do “*burst*” respiratório de leucócitos pulmonares em animais que receberam, por gavagem, dieta oral enriquecida com 5 mg/kg de ácidos graxos ômega-3 por duas semanas anteriores a indução de PA edematosa, em comparação com animais que receberam tratamento nutricional semelhante, mas com adição de ácidos graxos ômega-6 e animais controle com salina. Esses dados sugerem atenuação da intensidade resposta inflamatória sistêmica pela suplementação oral de ácidos graxos ômega-3 quando ministrados anteriormente à indução de pancreatite ⁽⁴⁸⁾.

2 RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

---

2 RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Modular favoravelmente a resposta inflamatória sistêmica após estresse traumático pode contribuir para prevenir ou atenuar complicações clínico-cirúrgicas¹⁻⁴. Nesse sentido, aplicação de terapia nutricional com nutrientes capazes de modular funções imunológicas e inflamatórias torna-se de grande interesse. Ácidos graxos ômega-3, contidos em EL de OP, fazem parte desse grupo de nutrientes e seu uso está associado à manutenção ou melhora de funções imunológicas e modulação favorável de marcadores inflamatórios na PA⁴⁰⁻⁴⁷.

A PA experimental é obtida por técnica bem definida e reproduzível. Sua prática tem sido amplamente explorada em diversos estudos^{49,50,51}, inclusive por nossa equipe de pesquisadores^{52,53,54,55}. A PA foi escolhida no presente projeto como modelo indutor de grave estresse inflamatório local e sistêmico.

A pancreatite aguda pós-cirúrgica pode acontecer em até 10% dos doentes submetidos a trauma de grande porte, que incluem complexas intervenções cirúrgicas do aparelho digestivo, longos períodos de isquemia pancreática por ocasião de extensas cirurgias cardiovasculares e *by-pass* cardiopulmonar^{31,32,33}. Procedimentos que envolvem a manipulação e infusão de contraste no ducto pancreático e biliar comum como colangiopancreatografia retrógrada (ERCP) também podem ocasionar pancreatite aguda com incidência que varia entre 5 e 40% dos pacientes^{35-37,56}. Uma vez instalada, a PA pode contribuir para o aumento de taxas de morbidade e mortalidade e sua gravidade tem relação com o grau da lesão pancreática e intensidade da resposta inflamatória sistêmica^{28-30,57}.

Por serem intervenções eletivas, essas operações e procedimentos endoscópicos permitem o preparo prévio dos pacientes, condicionando à resposta metabólica, com o intuito de evitar complicações pós-intervenção. O uso de EL de OP com seus potenciais efeitos anti-inflamatórios poderia minimizar a inflamação da PA⁴⁰⁻⁴⁷.

Neste sentido, o presente estudo pretende, de forma pioneira, avaliar experimentalmente a repercussão da infusão parenteral prévia de EL de OP puro na resposta inflamatória sistêmica e sobrevida em modelo de inflamação aguda representado por PA induzida por taurocolato de sódio a 3%.

3 OBJETIVOS

---

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a repercussão do uso parenteral prévio de emulsão lipídica de óleo de peixe puro sobre modulação da resposta inflamatória sistêmica e sobrevida em modelo inflamatório representado por pancreatite aguda em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da infusão parenteral prévia de EL de OP na cinética de biomarcadores da resposta inflamatória sistêmica, em três diferentes tempos (2, 12 e 24 horas), após indução de PA experimental.
- Avaliar o efeito da infusão parenteral prévia de EL de OP na sobrevida de animais submetidos à PA por até sete dias.

4 MÉTODOS

---

4 MÉTODOS

4.1 Local

O protocolo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM 35) da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP - em parceria com o Laboratório de Investigação Médica 37 (LIM 37) da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado, Laboratório de Emergências Clínicas (LIM 51), Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP e Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton no Reino Unido.

4.2 Aspectos Éticos

O presente estudo e todos os procedimentos envolvidos em seu protocolo foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq protocolo nº 0266/09, Anexo A).

O estudo contou com o apoio financeiro de auxílio pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, Processo nº 2011/02071-7; bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (BEPE), Processo nº 2013/25796-2 e bolsa Mestrado, Processo nº 2012/13691-9; fornecimento de frascos de emulsão lipídica de óleo de peixe (Omegaven® 10%) pela Fresenius-Kabi do Brasil; doação por comodato de 10 bombas de infusão volumétrica pela Baxter Hospitalar Ltda; e manipulação de bolsas parenterais específicas para o estudo pela Farmoterápica – Pharmacia Artesanal Ltda.

4.3 Delineamento Experimental

O presente estudo foi conduzido em duas fases distintas:

Fase 1- Com o objetivo de avaliar a repercussão do uso parenteral prévio de EL de OP rico em AG n-3 sobre biomarcadores da resposta inflamatória sistêmica em modelo de PA, após adaptação, animais de experimentação foram submetidos à cateterização venosa central, infusão intravenosa de solução salina fisiológica a 0,9% ou EL de OP, indução de modelo de PA por infusão de ácido taurocólico a 3% e sacrifício por punção cardíaca em períodos crescentes de tempo (2, 12 e 24 horas após indução de PA), com coleta de amostras de sangue e tecidos.

Fase 2 - Com o objetivo de identificar o efeito da infusão parenteral prévia de EL de OP na sobrevida de ratos submetidos à PA, após adaptação ao ambiente, animais foram submetidos à cateterização venosa central e infusão parenteral de solução salina 0,9% ou EL de OP, indução de modelo de PA por infusão de ácido taurocólico a 3% e observação por até sete dias. No sétimo dia, os animais que sobreviveram foram sacrificados por punção cardíaca, conforme métodos assegurados pelo comitê de ética. As Fases 1 e 2 estão ilustradas na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental das fases 1 e 2 do estudo:

4.4 Procedimentos gerais

4.4.1 Período de adaptação

Cinco dias anteriores ao início das atividades intervencionistas, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, em temperatura controlada (20 e 25°C), com livre acesso à água e ração oral padrão Nutrilav (Quimtia®, Jundiaí - Brasil), para adaptação ao ambiente de pesquisa.

4.4.2 Animais de experimentação

Foram estudados ratos isogênicos da linhagem *Lewis* (n = 132), machos e com peso médio de 350 gramas, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação foram seguidas no início do projeto de pesquisa, segundo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com Resolução nº 032/2006, seguido de normas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMUSP.

4.4.3 Cateterização do Sistema Venoso Central (CVC)

Todos os animais foram submetidos à cateterização do CVC. Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram pesados em balança digital (Marte Balanças®) com auxílio de recipiente próprio. Após obtenção do peso, foi calculado dose de anestésico cloridrato de cetamina 80 mg/Kg (Ketamin-S(+)® Cristália, Brasil) e cloridrato de xilazina- 8,0 mg/Kg (Rompun 2% ® - Bayer, Brasil), conforme indicação do fabricante (General Reference Book for sedation and anaesthesia, Bayer – 2004). A administração do preparado anestésico foi realizada com utilização de seringa de 1,0 mL na região intraperitonal dos animais. Sob efeito anestésico, estes foram tricotomizados,

com auxílio de lâmina, no local determinado para cada procedimento cirúrgico. Assepsia do local foi realizada com álcool iodado a 2%. A cateterização da veia jugular direita externa foi realizada conforme técnica padronizada por Lima-Gonçalves e colaboradores em 1990⁵⁸.

4.4.3.1 Descrição da técnica de cateterização venosa central

Com o animal em decúbito dorsal horizontal em campos estéreis realizou-se incisão transversa com aproximadamente 1,0 cm de extensão na região supraventricular direita. Posicionou-se o animal em decúbito ventral e com auxílio de agulha Intracath (Biotecno Produtos Plásticos e Médicos Ltda, São Paulo), a partir da borda distal da incisão, tunelizou-se o tecido subcutâneo em direção à região dorsal, com exteriorização a 1,0 cm da região retroauricular. Pelo interior do Intracath, passou-se cateter de silicone (Ciencor® Brasil), de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro e 70,0 mm de comprimento, que foi tracionado pelo túnel em direção incisão central. Fixou-se na região dorsal do animal uma peça metálica intermediária, composta por agulha anatomicamente adequada para ratos pela soldagem de duas asas laterais do tipo “borboleta”. As laterais continham dois orifícios paralelos em cada extremidade que possibilitaram a fixação da peça intermediária no dorso do animal por meio de dois pontos separados com fio mononylon 3-0 estéril, agulhado e não absorvível (Shalon® suturas, Brasil) que, por sua vez, atravessaram pele e tecido subcutâneo. Em seguida, o animal foi colocado em decúbito dorsal para identificação, dissecação e reparo da veia jugular direita com uso de fio de algodão torcido 4-0, estéril, pré-cortado, não absorvível e não agulhado (Polycot® - Ethicon, New Jersey, EUA). A veia jugular externa foi ligada diretamente e cateterizada na sua porção proximal pelo tubo de silicone que foi posicionado anteriormente, contendo solução fisiológica heparinizada (Figura 2). A incisão da pele foi suturada de forma contínua com fio mononylon 3-0 e desinfetada com álcool iodado 2%⁵⁸.

Figura 2 – Representação ilustrativa das quatro principais fases do procedimento cirúrgico de cateterização venosa central (CVC) em ratos⁵⁸:

4.4.4 Infusão parenteral

Imediatamente após cateterização venosa central, os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas individuais, conectando-se a “borboleta” a um intermediário de infusão capaz de girar em torno de seu eixo e, dessa forma, permitir a livre movimentação do animal, denominado *swíve*⁵⁹. Ao *swíve* foi conectado um cateter de polietileno, de aproximadamente 120 mm, ligado a equipo de infusão graduado (Equipo para bomba Colleague® - Baxter Hospitalar Ltda) que continha a solução a ser ministrada.

No pós-operatório imediato da CVC, todos os animais receberam infusão (0,25 mL/h) de solução salina 0,9% durante 24 horas, permanecendo em jejum oral e água *ad libitum*. Após este período, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: 1) grupo solução salina (SS), que permaneceu sob infusão de solução salina fisiológica 0,9% por mais 48 horas; 2) grupo óleo de peixe (OP), que passou a receber infusão de EL de OP por 48 horas e 3) grupo sem infusão (SI), que não foi contemplado com infusão intravenosa, conforme ilustrado no Quadro 1 na seção de resultados. Todos os grupos de animais permaneceram com livre acesso à ração oral padrão e água *ad libitum*. A composição de EL de OP (Omegaven® 10% - Fresenius-Kabi® Bad – Homburg, Alemanha) encontra-se descrita na Tabela 1.

As soluções infundidas foram encaminhadas em bolsas individuais de infusão, previamente preparadas pela empresa Farmacêutica de Manipulação

Famoterápica (São Paulo, Brasil). Padronizou-se o volume total de infusão diária de 6 mL por animal. Para isso, as bolsas de infusão do grupo salina (SS) foram preparadas pela adição de 6 mL de solução fisiológica a 0,9%, enquanto as do grupo experimental de óleo de peixe (OP) foram preparadas pela adição de 0,4g/Kg de peso corpóreo de EL de OP (1mL – emulsão lipídica Omegaven® 10%) acrescidos de solução salina 0,9% em quantidade suficiente (5 mL) para atingir-se o volume final total de 6 mL.

Procedeu-se troca das bolsas parenterais em intervalos de 12 horas, para viabilizar adequada estabilidade físico-química e microbiológica da EL de OP, conforme orientação da equipe farmacêutica responsável pela produção das bolsas de infusão intravenosa. O acompanhamento pós-operatório foi feito diariamente ao longo de todo experimento para registro do volume de infusão intravenosa, peso corpóreo e eventuais alterações do estado geral do animal em fichas individualizadas. Animais com prejuízo da infusão parenteral pela retirada e/ou perda do *swível* ou do equipo de infusão, foram excluídos do estudo.

Tabela 1 - Composição da emulsão lipídica de óleo de peixe Omegaven® 10% - Fresenius-Kabi

Componente	Quantidade
Energia (Kcal/ mL)	1,12
Óleo (mL)	100
Fosfatídeo de ovo (mL)	12
Glicerol (mL)	25
Tocoferol (Vitamina E) (mL)	0,2
Água (mL)	1000
Ácidos Graxos (g)	Quantidade
Mirístico (C14:0)	4,7
Palmítico (C16:0)	10,6
Palmitoleico (C16:1)	8,6
Esteárico (C18:0)	2,1
Oleico (C18:1 ω -9)	14,3
Linoleico (C18:2 ω -6)	3,3
Araquidônico (C20:4 ω -6)	2,3
Estearidônico (C18:4 ω -3)	3,8
α -linolênico (C18:3 ω -3)	1,2
Eicosapentaenoico (C20:5 ω -3)	20,6
Docosapentaenoico (C22:5 ω -3)	2,4
Docosaexaenoico (C22:6 ω -3)	15,8

Valores fornecidos pelo fabricante (Fresenius-Kabi® Bad – Homburg, Alemanha)

4.4.5 Indução de Pancreatite Aguda

Previamente ao procedimento de indução da PA, foi realizada anestesia dos animais com administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina 80 mg / Kg (Ketamin-S(+)® Cristália, Brasil) e cloridrato de xilazina- 8,0mg/Kg (Rompun 2% ® - Bayer, Brasil), conforme indicação do fabricante (General Reference Book for sedation and anaesthesia, Bayer – 2004) e após tricotomia abdominal e antisepsia com polivinil-pirrolidona-iodo em campos estéreis.

Procedeu-se abertura da cavidade abdominal, por incisão mediana infra-xifoídia de aproximadamente 1,0 cm e exteriorização do arco duodenal e pâncreas, identificação e oclusão do duto biliar ao nível do hilo hepático com pinça tipo bulldog, punção da porção contramesentérica do duodeno com agulha 25 x 7 e cateterização do ducto biliar com cateter polietileno. Posteriormente, induziu-se PA foi por meio de injeção retrógrada de solução de taurocolato de sódio a 3% (Taurocholic acid, sodium salt, Sigma-Chemical Company™, St. Louis, U.S.A) no duto pancreático, na dose de 0,5 mL/animal, com tempo médio de infusão de 60 segundos. Finalmente, procedeu-se o fechamento da punção duodenal com ponto em x, com nylon 6-0, e fechamento por planos da parede abdominal, com nylon 5-0⁶⁰. A Figura 3 ilustra o aspecto pancreático após indução de PA. Após finalizado o procedimento, os animais foram retornados às gaiolas metabólicas individuais e permaneceram com livre acesso à água e ração oral padrão, até o momento do sacrifício.

Figura 3 – Aspecto do arco duodenal e do pâncreas após a indução da pancreatite, com presença de hiperemia e edema do tecido pancreático, o duto biliar cateterizado e ocluído junto ao hilo hepático e o arco duodenal reparado⁶⁰.

4.5 Procedimentos específicos da Fase 1

Em intervalos crescentes de 2, 12 e 24 horas da indução PA, animais foram induzidos à eutanásia, após anestesia intraperitoneal com 80 mg/Kg de cloridrato de cetamina (Ketamin-S(+))® Cristália, Brasil) e 8,0 mg/Kg de cloridrato de xilazina- (Rompun 2% ® - Bayer, Brasil) e coleta de amostras de sangue por punção cardíaca. Seguida à eutanásia, procedeu-se incisão abdominal, para coleta de líquido ascítico e de amostras de fígado, pulmão e pâncreas. As amostras sanguíneas foram utilizadas para dosagem dos níveis séricos de citocinas, amilase e da concentração de ácidos graxos EPA e DHA; amostras de líquido ascítico foram utilizadas para dosagem de TNF- α ; enquanto que as amostras teciduais foram utilizadas para avaliação histopatológica (pâncreas), expressão de proteínas de choque térmico 70 e 90 (fígado e pulmão), concentração de eicosanoides (pulmão) e para análise dos níveis de malonaldeído (fígado).

4.5.1 Citocinas Séricas

Os níveis séricos de IL-1 β , 2, 4, 6, 10, INF- γ e TNF- α foram determinados em 500 μ L de soro por imunoensaio com microesferas do tipo multiplex, com uso de kit disponível comercialmente para ratos (RECYTMAG- 65K-07, Genesis Ltda) em analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA), de acordo com as instruções do fabricante descritas no anexo B ⁽⁶¹⁾. A análise foi executada nos períodos de 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda.

4.5.2 Amilase sérica

Amilase sanguínea foi quantificada por método enzimático colorimétrico, com emprego do kit MAK009 (SIGMA-ALDREICH®), conforme recomendações

do fabricante. A análise foi realizada no período de 2 horas após indução de pancreatite aguda⁶².

4.5.3 TNF- α no líquido ascítico

A quantidade de TNF- α em líquido ascítico foi determinada pelo método de imunoensaio (ELISA), através da utilização do kit RT TNF ALPHA ELISA KIT (Life Technologies), conforme recomendações do fabricante. A análise foi realizada no período de 2 horas após indução de pancreatite aguda⁶³.

4.5.4 Proteínas de Choque Térmico (HSP) 70 e 90

Aproximadamente 100 mg de tecido pulmonar e 50 mg do tecido hepático foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material foi homogeneizado em tampão de lise RIPA (100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de NP40, 150 mM de NaCl, 0.1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1 mg/mL pepstatina A, 100 mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad). As amostras de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (2% SDS, 60 mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1.5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho semi-dry transfer (Bio-Rad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de leite desnatado em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em TBST e incubadas com o anticorpo primário contra as proteínas de interesse (Santa Cruz, Biotechnology) *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo

anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:1000) (Santa Cruz, Biotechnology) e expostas ao sistema de detecção Super Signal (Pierce)⁶⁴. A expressão da proteína foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “Image J”, criado por Wayne Rasband do National Institutes of Mental Health, NIH, USA. A análise foi realizada nos períodos de 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda.

4.5.5 Análise de peroxidação lipídica

A determinação da concentração de Malondialdeído (MDA) foi utilizada para determinar a taxa de peroxidação lipídica. Fragmentos de 100 mg do tecido hepático foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1 mL de KCl 1,15%. O material permaneceu sob agitação a 4°C, durante 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante. Para a reação, adicionou-se a 100 µl de amostra, 100 µl SDS (duodecil sulfato de sódio) a 8,1%, 750 µl de ácido acético a 20%, e 750 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8%. A mistura foi aquecida a 95 °C por 40 minutos. A solução foi centrifugada e medida sua absorbância a 532 nm⁶⁵. A análise foi realizada nos períodos de 2 e 12 horas após indução de pancreatite aguda.

4.5.6 Determinação de Ácidos Graxos ômega-3 EPA e DHA

Os lipídios foram extraídos da amostra de plasma com clorofórmio: metanol (2: 1) e os fosfolípides foram isolados por cromatografia de camada fina com a utilização de uma mistura de hexano: éter etílico: ácido acético (90: 30: 1), utilizando o método de Folch et al ⁽⁶⁶⁾. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram preparados por meio de incubação com 140 g / L de trifluoreto de boro e metanol a 80 °C por 60 min. Posteriormente ao processo de extração, os ésteres metílicos de ácidos graxos foram secos e separados por cromatografia em fase gasosa de alta resolução, utilizando-se um cromatógrafo

a gás (Shimadzu, 2010) com detector de ionização em chama (FID), equipado com uma coluna Omegawax® 250 (Supelco). As condições de operação da coluna corresponderam à temperatura inicial de 180°C (1 minuto) e posteriormente de 270°C (5 minutos), com tempo total da corrida de 36 minutos. Os ácidos graxos foram quantificados por padronização externa, utilizando seus padrões de referência, para obtenção da curva de calibração. A análise foi realizada nos períodos de 2 horas após indução de pancreatite aguda.

4.5.7 Histopatologia Pancreática

Fragmentos do tecido pancreático foram retirados e fixados em aldeído fórmico a 10%. Em seguida, foram incluídos em parafina, cortados em espessura de 5 µm, corados através da técnica de hematoxilina-eosina e observados por microscopia ótica. A avaliação do tecido pancreático foi realizada através da utilização da classificação do processo inflamatório pancreático proposto por Schmidt e colaboradores, disponível no Anexo C⁶⁷, analisando as variáveis: edema, necrose acinar, hemorragia, necrose gordurosa, inflamação e infiltrado perivascular. A graduação do processo inflamatório foi realizada através da atribuição de pontos para cada uma das variáveis descritas e, posteriormente, analisada e comparada entre os diferentes grupos estudados. A análise histopatológica foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP por patologista especializado em histologia pancreática, sendo que o mesmo não possuía conhecimento dos grupos estudados. A análise foi realizada nos períodos de 2 e 12 horas, após indução de pancreatite aguda.

4.5.8 Análise de Medidores Lipídicos Pulmonares

Amostras de pulmão foram lavadas com PBS e congeladas em nitrogênio líquido a -80°C. O material foi transportado para o Departamento de Pesquisa

em Imunologia da Universidade de Southampton - Reino Unido contemplando todas as normas e exigências para importação de produtos destinados à pesquisa científica - RDC nº 1 de 22/01/08 – ANVISA, realizado pela empresa World Courier. Para análise de mediadores lipídicos prostaglandina E2 (PGE2), leucotrieno B4 (LTB4), tromboxano B2 (TXB2) e lipoxina A4 (LPA4), 100 mcg de tecido pulmonar foram submetidos ao protocolo proposto por Shirai⁶⁸ com algumas adaptações. As amostras teciduais foram adicionadas de 0,8 ml de NaCl 0,9% gelado e homogeneizadas com auxílio de equipamento Untraturrax. Em seguida, as amostras foram adicionadas de 1 mL de solução NaOH 0,5 M em metanol e 500 uL de amostra e foi procedida homogeneização com uso de vórtex, por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram avaliadas pelo método de ELISA, conforme a orientação do fabricante descrita nos kits PGE2 (AB133021), LTB4 (ADI0900 068), TB2 (ABIN 1154890) e LPA4 (K96T)⁵⁷. A análise foi realizada nos períodos de 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda.

4.6 Procedimentos específicos da Fase 2

Após indução de PA, os vinte ratos de cada grupo foram mantidos vivos por até sete dias, com livre acesso à ração oral padrão e água *ad libitum*. Os animais foram observados individualmente em intervalos de 8 horas para registro de observações clínicas e do tempo de morte. Aqueles animais que sobreviveram até o 7º dia pós-PA foram sacrificados por aprofundamento de anestésico, com injeção intraperitonal com 80 mg/Kg de cloridrato de cetamina (Ketamin-S(+)® Cristália, Brasil) e 8,0mg/Kg de cloridrato de xilazina- (Rompun 2% ® - Bayer, Brasil).

4.7 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados, adotou-se limite de confiança de 5% para todos os testes realizados. Dados de biomarcadores inflamatórios,

histológicos, de concentrações de EPA e DHA e de estresse oxidativo, foram comparados entre os grupos salina e sem infusão (controle) utilizando-se análise de variância (ANOVA), em conformidade com a normalidade e teste Kruskal-Wallis. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo *t de Student* com correção de *Bonferroni*^{69,70}. A mortalidade dos animais foi avaliada por gráfico *Kaplan-Meier*⁷¹. As análises estatísticas foram realizadas com SPSS 18,0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA) com participação do estaticista João Ítalo França.

5 RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

5.1 Considerações gerais

Devido a dificuldades técnicas encontradas durante o desenvolvimento da pesquisa, ocorreram alterações no cronograma de análises previstas no início do estudo. Por tal fato, não foram completados a cinética completa (2, 12 e 24 horas) nas variáveis de MDA e da histologia pancreática.

Para facilitar a redação dos resultados da Fase 1, optou-se por acrescentar os números 2, 12 e 24 horas na frente da sigla de cada grupo, a fim de identificar os animais que foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de PA, respectivamente, conforme mostra o quadro 1. Os números não foram utilizados para representar os animais da Fase 2, pois estes não foram intencionalmente sacrificados até o sétimo dia de observação.

Alguns resultados que não apresentaram diferença significativa não foram ilustrados nesta dissertação.

Quadro 1 – Nomenclatura dos grupos experimentais que compuseram a Fase 1 do estudo.

Grupo Salina (SS2): submetido à CVC, com infusão IV de solução salina por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 2 horas após PA.

Grupo Experimental (OP2): submetido à CVC, com infusão IV de EL de OP por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 2 horas após PA.

Grupo sem infusão (SI2): submetido à CVC, sem infusão IV por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 2 horas após PA.

Grupo Salina (SS12): submetido à CVC, com infusão IV de solução salina por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 12 horas após PA.

Grupo Experimental (OP12): submetido à CVC, com infusão IV de EL de OP por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 12 horas após PA.

Grupo sem infusão (SI12): submetido à CVC, sem IV por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 12 horas após PA.

Grupo Salina (SS24): submetido à CVC, com infusão IV de solução salina por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 24 horas após PA.

Grupo Experimental (OP24): submetido à CVC, com infusão IV de EL de OP por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 24 horas após PA.

Grupo sem infusão (SI24): submetido à CVC, sem infusão IV por 48 horas e indução de PA. Sacrifício 24 horas após PA.

Legenda: CVC (Cateterização venosa central), IV (intravenosa)

5.2 Dados gerais

De acordo com os registros diários de evolução clínica, não foram encontradas alterações dignas de nota durante o período de experimentação. Observou-se perda de peso média de $8,16 \pm 17,61$ gramas entre os períodos antes e 72 horas após infusão parenteral. Como se pode observar na Figura 4, o grupo OP apresentou aparente perda de peso corpóreo, quando comparado aos outros grupos experimentais, porém sem significância estatística em nível de 5% (Kruskall-Wallis, Δ peso = 0,16).

Tabela 2 – Peso corpóreo (g) de ratos *Lewis* antes e após a infusão parenteral de diferentes soluções.

Peso (g)	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor ¹	P-valor ²
Antes	SS	284,00	264,00	345,00	274,00	302,00	0,5874	0,3537
	OP	272,00	246,00	342,00	270,00	290,00		
	SI	299,00	238,00	325,00	273,50	310,50		
Após	SS	275,00	250,00	350,00	267,00	308,00	---	0,1570
	OP	268,00	200,00	305,00	255,00	284,00		
	SI	285,00	243,00	325,00	271,50	298,00		

Legenda – SS: solução salina; OP: óleo de peixe; SI: sem infusão; ¹ANOVA; ²Kruskal-Wallis

Figura 4 – Variação de peso corpóreo (g) de ratos *Lewis* antes e após a infusão parenteral de diferentes soluções.

Legenda – SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão

5.3 Resultados da Fase 1

5.3.1 Citocinas

IL1- β

A análise intergrupos dos períodos isolados de 2, 12 e 24 horas após indução de PA não encontrou diferenças significativas nas concentrações séricas de IL1- β entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$; Figura 5). O estudo intragrupo da cinética dos tempos de 2, 12 e 24 horas após indução de PA encontrou maiores concentrações séricas de IL1- β nos animais do grupo OP12, em relação aos animais dos grupos OP2 (valor de $p = 0,01$) e OP24 ($p = 0,0006$), conforme mostra a Figura 6.

Figura 5 - Níveis séricos (pg/ml) de IL-1 β de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda – SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão.

Kruskal-Wallis (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

Figura 6 – Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-1 β de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda – SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis # OP2 vs OP12 ($p = 0,01$) e * OP12 vs OP24 ($p = 0,0006$)

IL-2

A análise intergrupos dos períodos isolados de 2 e 24 horas após indução de PA não encontrou diferenças significativas nas concentrações séricas de IL-2 entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$; Figura 7). No entanto, 12 horas após indução de PA encontraram-se maiores concentrações séricas de IL-2 no grupo OP, comparado ao grupo SI ($p = 0,01$; Figura 7). O estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA encontrou maiores concentrações séricas de IL-2 nos animais do grupo SI24, em relação aos animais dos grupos SI12 ($p = 0,0017$), conforme mostra a Figura 8.

Figura 7 - Níveis séricos (pg/ml) de IL-2 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis * OP12 vs SI12, ($p=0,01$)

Figura 8 – Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-2 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis * SI12 vs SI24, ($p=0,0017$)

IL-4

A análise intergrupos dos períodos isolados de 2, 12 e 24 horas após indução de PA não encontrou diferenças significativas nas concentrações séricas de IL-4 entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$). O estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA encontrou menores concentrações séricas de IL-4 nos animais do grupo OP24, em relação aos animais do grupo OP12 ($p = 0,0019$), conforme mostra a Figura 9.

Figura 9 – Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-4 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis * OP12 vs OP24, ($p = 0,0019$)

IL-6

A análise intergrupos dos períodos isolados de 2, 12 e 24 horas após indução de PA não encontrou diferenças significativas nos níveis séricos de IL-6 entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$). O estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA encontrou maiores concentrações séricas de IL-6 no grupo OP12, em relação aos grupos OP2 ($p = 0,005$) e OP24 ($p = 0,05$), conforme mostra a Figura 10.

Figura 10 - Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-6 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis # OP2 vs OP12 ($p=0,005$) e *OP12 vs OP24 ($p=0,05$)

IL-10

A análise intergrupos dos períodos isolados de 2 e 24 horas após indução de PA, não encontrou diferenças significativas das concentrações séricas de IL-10 entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$; Figura 11). No entanto, 12 horas após indução de PA, animais do grupo OP apresentaram menores concentrações séricas de IL-10, quando comparado àqueles do grupo SI ($p = 0,002$; Figura 11). O estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA encontrou diminuição ao longo do tempo das concentrações séricas de IL-10 nos animais do grupo SS (SS2 vs SS12, $p = 0,002$; SS12 vs SS24, $p = 0,008$); menores concentrações séricas dessa citocina nos animais do grupo OP12, em relação àqueles do grupo OP2 ($p = 0,01$); e nos animais do grupo SI24, em relação àqueles do grupo SI12 ($p = 0,007$), conforme mostra a Figura 12. Houve tendência de maiores concentrações séricas de IL-10 nos animais do grupo OP24 em relação àqueles do grupo OP12 ($p = 0,06$; Figura 12).

Figura 11 - Níveis séricos (pg/ml) de IL-10 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis *OP12 vs SI12 ($p=0,002$)

Figura 12 – Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-10 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis #SS2 vs SS12 ($p=0,002$) e OP2 vs OP12 ($p=0,01$); *SS12 vs SS24 ($p=0,008$), OP12 vs OP24 ($p=0,06$) e SI12 vs SI24 ($p=0,007$)

IFN- γ

A análise intergrupos do período isolado de 2 horas após indução de PA, não houve diferença significativa das concentrações séricas de IFN- γ entre os animais dos grupos SS, OP e SI. Não foi possível realizar o estudo intragrupo da cinética de IFN- γ , devido às baixas concentrações dessa citocina encontradas nos tempos de 12 e 24 horas, que inviabilizaram sua dosagem pelo método Luminex.

TNF- α :

A análise intergrupos do período isolado de 2 horas após indução de PA, animais do grupo SS apresentaram maiores concentrações séricas de TNF- α , em relação àqueles do ao grupo SI ($p = 0,03$; Figura 13). No entanto, nos tempos isolados de 12 e 24 horas após indução de PA, não houve diferenças significativas das concentrações séricas dessa citocina entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$). O estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA encontrou maiores concentrações séricas de TNF- α nos animais do grupo SS24, em relação àqueles do grupo SS12 ($p = 0,03$); encontrou ainda aumento das concentrações séricas dessa citocina ao longo do tempo nos animais do grupo SI (SI2 vs SI12, $p = 0,001$; SI12 vs SI24; $p = 0,005$), conforme mostra a Figura 14.

Figura 13 - Níveis séricos (pg/ml) de TNF- α de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis *SS2 vs SI2 ($p = 0,03$)

Figura 14 – Cinética dos níveis séricos (pg/ml) de IL-10 de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis #SS12 vs SS24 ($p=0,03$), SI2 vs SI12 ($p=0,001$) e *SI12 vs SI24 ($p=0,005$)

IL-6/IL-10:

A cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA da razão IL-6/IL-10 foi estudada intragrupo. Encontrou-se aumento dessa razão entre os períodos de 12 e 24 horas nos animais dos grupos SS (SS 12 vs SS 24, $p=0,044$) e SI (SI 12 vs SI 24, $p=0,049$), mas não nos animais do grupo OP ($p>0,05$ para todos os períodos estudados), conforme mostra a Figura 15.

Razão IL-6/IL-10

Figura 15 – Relação (pg/ml) de IL-6/IL-10 na cinética de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2, 12 e 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis #SS12 vs SS24 ($p=0,044$), SI12 vs SI24 ($p=0,049$)

5.3.2 TNF- α no líquido ascítico

A análise de TNF- α no líquido ascítico no período de 2 horas após a indução de PA não mostrou diferenças significativas entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$). Nos períodos de 12 e 24 horas após PA não houve a produção de líquido ascítico na grande maioria dos animais e, portanto, não foram realizadas coletas de líquido ascítico para a análise de suas concentrações de TNF- α nesses períodos. Dados não ilustrados.

5.3.3 Amilase sérica

A análise dos níveis de amilase sérica feita após 2 horas da indução de PA não revelou alterações significativas desse marcador, entre os grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$; Figura 16).

Figura 16 - Níveis (U/L) de amilase sérica de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

5.3.4 HSP 70 e 90 Pulmonar e Hepática

Análise intergrupos dos períodos isolados de 2, 12 e 24 horas após indução de PA

Os dados das concentrações de HSP 70 e HSP 90 nos tecidos pulmonar e hepático em animais sacrificados no período de 2 horas pós-PA são obtidos nas Tabelas 3. No tecido pulmonar, observou-se maior expressão de HSP 90 no grupo OP, comparado ao grupo SI ($p = 0,015$; Tabela 3) e não foram encontradas alterações na expressão de HSP 70 ($p > 0,05$; Tabela 3). No tecido hepático, observou-se menor expressão de HSP 70 nos animais do grupo OP, comparado ao grupo SI ($p = 0,007$; Tabela 3). A expressão de HSP 90 no tecido hepático não foi detectada nesse período, para que pudesse ser avaliada.

No tecido pulmonar de ratos sacrificados 12 horas após indução de PA não houve diferença significativa na expressão de HSP70 e HSP90 ($p > 0,05$; Tabela 4); no tecido hepático, observou-se maior expressão de HSP 90 no grupo OP, comparado aos grupos SS ($p = 0,04$) e SI ($p = 0,03$) e não houve diferença da expressão de HSP 70 ($p > 0,05$) nesse período, conforme descreve a Tabela 4.

Nos animais sacrificados 24 horas após indução de PA não foram encontradas diferenças significativas de HSP70 e 90 em fragmentos do tecido pulmonar ($p > 0,05$; Tabela 5); no tecido hepático, encontrou-se maior expressão de HSP90 no grupo SI, comparado com o grupo SS ($p = 0,028$; Tabela 5).

Análise intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA

No tecido pulmonar, o estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA mostrou comportamento similar de HSP70 nos grupos SS, OP e SI, a saber: maiores expressões dessa proteína no período de 2 horas, em comparação ao período de 12 horas, e maiores expressões dessa proteína no período de 24 horas, em relação aos períodos de 2 e 12 horas ($p < 0,05$;

Tabela 6; Figura 17); a expressão de HSP90 nesse tecido foi similar nos grupos SS e OP, com maiores expressões dessa proteína no período de 2 horas, em comparação aos períodos de 12 e 24 horas, e maiores expressões dessa proteína no período de 24 horas, em comparação ao período de 12 horas ($p < 0,05$; Tabela 6; Figura 18). Não foram encontradas diferenças significativas no estudo cinético da expressão de HSP90 no pulmão dos animais do grupo SI ($p > 0,05$; Tabela 6; Figura 18).

No tecido hepático, o estudo intragrupo da cinética de 2, 12 e 24 horas após indução de PA mostrou comportamento similar da expressão de HSP70 nos grupos SS, e SI, a saber: maiores expressões dessa proteína no período de 2 horas, em comparação aos períodos de 12 e 24 horas, e no período de 24 horas, em comparação ao período de 12 horas ($p < 0,05$; Tabela 6; Figura 19). Animais do grupo OP, apresentaram aumento da expressão de HSP70 no fígado nos tempos de duas e 24 horas após indução de PA quando comparados com o tempo de 12 horas ($p < 0,05$; Tabela 6; Figura 19). A expressão de HSP90 no tecido hepático aumentou ao longo dos períodos estudados nos grupos SS, OP e SI ($p < 0,05$; Tabela 6; Figura 20).

Tabela 3 - Expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Variável	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
HSP70 Pulmão	SS2	15615447	7901083	29438518	14285740	20267619	0,408
	OP2	17622265	9779740	27175033	10363953	24266326	
	SI2	12956058	6409619	28148033	10096912	16820669	
HSP90 Pulmão	SS2	16654811	11612619	31128861	15125912	24525217	0,015*
	OP2	20362497	12879205	32510326	18819154	21141690	
	SI2	8037912	5916426	27779912	7573083	12943462	
HSP70 Fígado	SS2	27154796	18379004	51941539	22116953	32188418	0,007*
	OP2	16609054	13160196	44690660	14973761	24666246	
	SI2	34420660	25734175	46585539	30578261	41040332	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP90 no pulmão; ANOVA *OP2 vs SI2 ($p = 0,015$) e HSP70 no fígado *OP2 vs SI2 ($p = 0,007$)

Tabela 4 - Expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Variável	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-Valor
HSP70 Pulmão	SS12	7848,53	5112,70	11792,06	6816,65	9901,53	0,6859
	OP12	8748,43	4440,48	13884,31	6750,01	13568,63	
	SI12	7219,03	5074,28	12319,36	5854,35	10299,50	
HSP90 Pulmão	SS12	8078,94	5127,87	11036,06	6391,99	9511,06	0,8833
	OP12	8578,11	4922,16	15906,13	6465,86	11824,74	
	SI12	8745,23	4278,87	13088,48	5670,23	10699,65	
HSP70 Fígado	SS12	7496,70	5214,70	11807,53	6614,11	9658,06	0,0730
	OP12	11680,43	7387,94	16402,05	10301,66	13670,51	
	SI12	9875,41	3917,58	12444,36	7099,11	11308,06	
HSP90 Fígado	SS12	10013,70	6978,11	12492,89	7395,65	10262,65	0,0350* 0,0422*
	OP12	13082,31	8771,06	15329,89	10157,39	14111,37	
	SI12	8670,70	1834,21	12370,41	5527,41	11236,82	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP90 no fígado; ANOVA *OP12 vs SS12 ($p=0,03$) e *OP12 vs SI12 ($p=0,04$)

Tabela 5 - Expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 24 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Variável	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
HSP70 Pulmão	SS24	24064,33	18553,74	34310,76	21086,52	27653,86	0,1030
	OP24	26892,86	13973,74	42429,69	19258,80	33092,33	
	SI24	33718,04	26817,93	40908,40	28039,18	37862,98	
HSP90 Pulmão	SS24	14030,86	4820,91	35574,32	11408,98	28005,49	0,2432
	OP24	11919,03	9707,62	25449,72	10217,42	12570,88	
	SI24	9094,45	6197,57	26016,03	7174,33	12214,12	
HSP70 Fígado	SS24	24495,10	20199,86	31198,40	20696,13	24938,48	0,0962
	OP24	27771,10	19816,93	39538,76	26860,05	32297,42	
	SI24	20685,96	12562,74	35371,52	14078,93	21386,57	
HSP90 Fígado	SS24	19507,40	16357,15	34854,88	17368,44	25290,60	0,0280*
	OP24	28634,69	23792,40	39020,47	26482,87	30591,31	
	SI24	33760,69	26817,93	40908,40	30857,29	37946,54	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP90 no fígado; ANOVA *SS24 vs SI24 ($p=0,0280$)

Tabela 6 – Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 e HSP90 em fragmentos de tecido pulmonar e hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções

	Grupo	Temp o	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
HSP70 Pulmão	OP	2h	17622,27	9779,74	27175,03	11021,06	23288,44	0,0026*
		12h	8748,43	4440,48	13884,31	6750,01	13568,63	
		24h	26892,86	13973,74	42429,69	19258,80	33092,33	
	SS	2h	15615,45	7901,08	29438,52	14285,74	20267,62	0,0003*
		12h	7848,53	5112,70	11792,06	6816,65	9901,53	
		24h	24064,33	18553,74	34310,76	21086,52	27653,86	
	SI	2h	12956,06	6409,62	28148,03	10296,88	16299,15	0,0005*
		12h	7219,03	5074,28	12319,36	6081,46	9525,72	
		24h	33718,04	26817,93	40908,40	29448,23	36837,41	
HSP70 Fígado	OP	2h	16609,05	13160,20	44690,66	14973,76	24666,25	0,0010*
		12h	11680,43	7387,94	16402,05	10301,66	13670,51	
		24h	27771,10	19816,93	39538,76	26860,05	32297,42	
	SS	2h	27154,80	18379,00	51941,54	22459,29	32101,18	0,0002*
		12h	7496,70	5214,70	11807,53	6614,11	9658,06	
		24h	24495,10	20199,86	31198,40	20696,13	24938,48	
	SI	2h	34420,66	25734,18	46585,54	30578,26	41040,33	0,0002*
		12h	9875,41	3917,58	12444,36	7099,11	11308,06	
		24h	20685,96	12562,74	35371,52	15600,31	21341,79	
HSP90 Pulmão	OP	2h	5510,61	12879,21	32510,33	18819,15	21141,69	0,0028*
		12h	4095,80	4922,16	15906,13	6465,86	11824,74	
		24h	5517,31	9707,62	25449,72	10217,42	12570,88	
	SS	2h	6769,48	11612,62	31128,86	15125,91	24525,22	0,0022*
		12h	2063,63	5127,87	11036,06	6391,99	9511,06	
		24h	11956,85	4820,91	35574,32	11408,98	28005,49	
	SI	2h	7275,97	5916,43	27779,91	7573,08	12943,46	0,6050*
		12h	3078,47	4278,87	13088,48	5809,17	10268,59	
		24h	7215,08	6197,57	26016,03	7850,98	12574,54	
HSP90 Fígado	OP	2h	-	-	-	-	-	0,0025*
		12h	2581,74	8771,06	15329,89	10157,39	14111,37	
		24h	4740,00	26989,10	39020,47	28634,69	31944,69	
	SS	2h	-	-	-	-	-	0,0002*
		12h	1887,06	6978,11	12492,89	7395,65	10262,65	
		24h	7252,86	16357,15	34854,88	17368,44	25290,60	
	SI	2h	-	-	-	-	-	0,0004*
		12h	3600,88	1834,21	12370,41	5527,41	11236,82	
		24h	4749,89	26817,93	38030,10	29448,23	36837,41	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP70 e 90 no pulmão; ANOVA **SS, **OP, **SI; HSP70 e 90 no fígado **SS, **OP, SI. O símbolo "***" refere-se significância estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos.

Figura 17 – Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 em fragmentos de tecido pulmonar de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções.

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP70 e 90 no pulmão; ANOVA **SS, **OP, **SI; HSP70 e 90 no fígado **SS, **OP, SI. O símbolo “**” refere-se significância estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos.

Figura 18 – Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 90 em fragmentos de tecido pulmonar de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções.

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP90 no pulmão; ANOVA **SS2 vs SS12 vs SS24; **OP2 vs OP12 vs OP24. O símbolo “**” refere-se significância estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos.

HSP 70 Fígado

Figura 19 – Cinética de 2, 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 70 em fragmentos de tecido hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções.

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP70 no fígado; ANOVA **SS2 vs SS12 vs SS24; **OP2 vs OP12 vs OP24; **SI2 vs SI12 vs SI24. O símbolo “**” refere-se significância estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos.

HSP 90 Fígado

Figura 20 – Cinética de 12 e 24 horas da expressão (unidades arbitrárias - U.A) de HSP 90 em fragmentos de tecido hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções.

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; HSP90 no fígado; ANOVA **SS12 vs SS24; **OP12 vs OP24. O símbolo “**” refere-se significância estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos.

5.3.5 Determinação de MDA

Os grupos de animais sacrificados 2 horas após indução de PA não apresentaram alterações da concentração de MDA no tecido hepático. Em animais sacrificados 12 horas após indução de PA, encontrou-se a tendência ($p = 0,07$) para maiores concentrações de MDA no tecido hepático de animais do grupo OP, em relação aos grupos SS e SI (Figura 21), sem significância estatística em nível de 5%. O estudo intragrupo da cinética dos tempos de 2 e 12 horas encontrou menores concentrações hepáticas de MDA no período de 12 horas após indução de PA nos animais dos grupos SS (SS2 vs SS12; $p = 0,0445$) e SI (SI2 vs SI12; $p = 0,0067$), mas não nos animais do grupo OP (OP2 vs OP12; $p = 1,000$), conforme os dados descritos na Tabela 7.

Figura 21 - Níveis ($\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) de MDA no tecido hepático de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis (SS12 vs OP12 vs SI12; $p > 0,05$)

Tabela 7 – Cinética dos tempos de 2 e 12 horas dos níveis ($\mu\text{M}/\text{mg}$ tecido) de MDA em fragmento hepático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções

Grupo	Tempo	Média	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
SS	2h	3,06	2,44	4,60	2,56	3,10	0,0445*
	12h	2,37	1,60	3,80	1,93	2,63	
OP	2h	2,96	2,30	3,70	2,62	3,23	1,0000
	12h	3,03	1,30	4,50	2,10	4,15	
SI	2h	3,54	2,41	4,90	3,10	4,12	0,0067*
	12h	1,98	1,30	4,60	1,48	1,83	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis *SS2 vs SS12 ($p=0,04$) e SI2 vs SI12 ($p=0,0067$)

5.3.6 Determinação de EPA e DHA

A determinação da concentração plasmática de ácidos graxos ômega-3 EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3) no período de 2 horas após a indução de pancreatite mostrou aumento da concentração de DHA nos grupos OP e SS comparado com o grupo SI ($p < 0,05$), conforme ilustrado na figura 22. Não houve alteração significativa na concentração de EPA no tempo de 2 horas após indução PA em nenhum dos grupos estudados (SS, OP e SI).

Figura 22 – Concentração de ácido graxo ômega-3 DHA (22:6 n-3) no plasma de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; ANOVA *SS2 vs SS12 e OP2 vs SI2 ($p < 0,05$)

5.3.7 Histologia do Pâncreas

As variáveis edema, necrose acinar, hemorragia, necrose gordurosa, inflamação e infiltrado perivascular foram avaliadas em conjunto e separadamente. Animais sacrificados nos tempos isolados de 2 e 12 horas após indução de PA não apresentaram alterações histopatológicas no tecido pancreático, em nenhum dos grupos estudados (SS, OP e SI; Tabelas 8 e 9). O estudo intragrupo da cinética dos tempos de 2 e 12 horas encontrou maiores escores de edema e necrose gordurosa no tecido pancreático dos animais do grupo SS respectivamente (SS2 vs SS12, $p=0,0278$; SS2 vs SS12; $p=0,0002$), mas não em animais do grupo OP ($p > 0,05$), conforme descrevem os dados da Tabela 10 e mostram as Figuras 23 e 24.

Tabela 8 – Resultados das variáveis histológicas de tecido pancreático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 2 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Variável	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Edema	SS2	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	0,128
	OP2	2,00	0,50	2,00	1,50	2,00	
	SI2	1,75	0,50	2,50	1,50	2,00	
Necrose Acinar	SS2	2,50	0,50	3,50	2,00	3,25	0,546
	OP2	3,25	0,00	4,00	2,50	3,50	
	SI2	2,50	0,00	4,00	1,50	3,50	
Infiltrado Inflamatório	SS2	0,50	0,50	2,00	0,50	0,50	0,144
	OP2	1,50	0,50	2,00	0,50	1,50	
	SI2	0,50	0,00	2,00	0,50	1,50	
Hemorragia	SS2	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,361
	OP2	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	
	SI2	0,25	0,00	0,50	0,00	0,50	
Necrose Gordurosa	SS2	0,00	0,00	1,00	0,00	0,25	0,679
	OP2	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	
	SI2	0,25	0,00	1,00	0,00	0,50	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

Tabela 9 – Resultados das variáveis histológicas de tecido pancreático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados 12 horas após indução de pancreatite aguda experimental

Variável	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Edema	SS12	2,00	1,50	2,50	1,50	2,50	0,2271
	OP12	1,50	0,50	2,50	1,50	2,00	
	SI12	1,50	1,00	3,00	1,50	1,50	
Necrose Acinar	SS12	3,50	0,50	4,00	3,00	4,00	0,3347
	OP12	3,50	0,00	3,50	0,75	3,50	
	SI12	3,00	1,50	4,00	3,00	3,50	
Infiltrado Inflamatório	SS12	0,50	0,00	1,50	0,50	1,50	0,7975
	OP12	1,00	0,00	1,50	0,75	1,25	
	SI12	0,50	0,50	2,00	0,50	0,50	
Hemorragia	SS12	0,00	0,00	1,50	0,00	0,50	0,2681
	OP12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	SI12	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	
Necrose Gordurosa	SS12	1,00	0,50	2,50	0,50	1,50	0,7666
	OP12	0,50	0,00	3,00	0,00	2,00	
	SI12	1,00	0,00	2,00	0,00	1,50	

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

Tabela 10 – Cinética de 2 e 12 horas das variáveis histológicas de tecido pancreático de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram sacrificados após indução de pancreatite aguda experimental

Variável	Grupo	Tempo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Edema	SS	2h	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	0,0278*
		12h	2,00	1,50	2,50	1,50	2,50	
	OP	2h	2,00	0,50	2,00	1,63	2,00	0,5339
		12h	1,50	0,50	2,50	1,50	2,00	
	SI	12h	1,50	1,00	3,00	1,50	1,50	0,4504
		12h	1,50	0,50	2,50	1,50	2,00	
Necrose Acinar	SS	2h	2,50	0,50	3,50	2,00	3,25	0,1316
		12h	3,50	0,50	4,00	3,00	4,00	
	OP	2h	3,25	0,00	4,00	2,50	3,50	0,6417
		12h	3,50	0,00	3,50	0,75	3,50	
	SI	12h	3,00	1,50	4,00	3,00	3,50	0,1353
		12h	3,00	1,50	4,00	3,00	3,50	

continua

conclusão								
Variável	Grupo	Tempo	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Infiltrado Inflamatório	SS	2h	0,50	0,50	2,00	0,50	0,50	0,9062
		12h	0,50	0,00	1,50	0,50	1,50	
	OP	2h	1,50	0,50	2,00	0,63	1,50	0,3303
		12h	1,00	0,00	1,50	0,75	1,25	
	SI	12h	0,50	0,50	2,00	0,50	0,50	1,0000
		12h	1,00	0,00	1,50	0,75	1,25	
Hemorragia	SS	2h	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,8059
		12h	0,00	0,00	1,50	0,00	0,50	
	OP	2h	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,2565
		12h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	SI	2h	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,3601
		12h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Necrose Gordurosa	SS	2h	0,00	0,00	1,00	0,00	0,25	0,0086*
		12h	1,00	0,50	2,50	0,50	1,50	
	OP	2h	0,00	0,00	1,00	0,00	0,38	0,1539
		12h	0,50	0,00	3,00	0,00	2,00	
	SI	12h	1,00	0,00	2,00	0,00	1,50	0,1222

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis *SS2 vs SS12 (edema; $p=0,0278$); *SS2 vs SS12 (necrose; $p=0,0086$)

Figura 23 – Cinética dos tempos de 2 e 12 horas do escore (expansão focal e difusa) de edema da histologia de tecido pancreático de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis *SS2 vs SS12 (edema; $p=0,0278$)

Figura 24 – Cinética dos tempos de 2 e 12 horas do escore (focos) de necrose gordurosa da histologia de tecido pancreático de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis *SS2 vs SS12 (necrose; $p = 0,0086$)

5.3.8 Medidores Lipídicos

No tecido pulmonar, a análise intergrupos dos tempos isolados de 12 e 24 horas após indução de PA não mostrou diferença significativa da expressão de medidores lipídicos entre os animais dos grupos SS, OP e SI ($p > 0,05$). O estudo intragrupo da cinética entre os tempos de 12 e 24 horas após indução de PA encontrou em todos os grupos estudados (SS, OP e SI) uma menor expressão de LTB₄ ($p < 0,05$; Figura 25), maior expressão de PGE₂ ($p < 0,05$; Figura 26) e ausência de alterações das concentrações de TXB₂ e LXA₄ ($P > 0,05$; Figuras 27 e 28, respectivamente), no tempo de 24 horas após indução de PA.

Figura 25 – Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de leucotrieno - LTB₄ no tecido pulmonar de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; ANOVA *SS12 vs SS24; *OP12 vs OP24; *SI12 vs SI24 ($p < 0,05$)

Figura 26 – Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de PGE₂ no tecido pulmonar de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; ANOVA *SS12 vs SS24; *OP12 vs OP24; *SI12 vs SI24 ($p < 0,05$)

Figura 27 – Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de tromboxano – TXB2 no tecido pulmonar de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; ANOVA (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

Figura 28 – Cinética dos tempos de 12 e 24 horas da concentração (PMNs) de lipoxina – LPX4 no tecido pulmonar de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções após indução de pancreatite aguda experimental

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; ANOVA (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

5.4 Resultados da Fase 2

5.4.1 Sobrevida

A relação do tempo de morte entre os grupos SS, OP e SI está representada na tabela 11. Não houve alteração significativa no tempo de sobrevida entre os grupos SS, OP e SI durante o período de observação de sete dias, conforme ilustrado no Gráfico 1.

Tabela 11 – Relação (mediana) do tempo de evento de morte de ratos *Lewis* que receberam infusão parenteral de diferentes soluções e foram observados até sete dias após indução de pancreatite aguda experimental

Grupos	Mediana do tempo de morte
SS	24 – 48 h
OP	30 – 42 h
SI	24 – 48 h

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kruskal-Wallis (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

Gráfico 1 – Sobrevida (tempo) de ratos *Lewis* que receberam a infusão parenteral de diferentes soluções, foram submetidos à indução de pancreatite aguda experimental e mantidos sob observação por período de sete dias após pancreatite.

Legenda - SS: Grupo solução salina; OP: Grupo óleo de peixe; SI: Grupo sem infusão; Kaplan Meyer (SS vs OP vs SI; $p > 0,05$)

6 DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

Estudos experimentais e clínicos têm mostrado o efeito favorável da suplementação de EL rica em ácidos graxos ômega-3 no tratamento da pancreatite aguda⁴⁰⁻⁴⁷, no entanto persistem lacunas no conhecimento do comportamento de marcadores inflamatórios perante esta modalidade de tratamento. Em ratos, sob infusão parenteral de emulsão lipídica de óleo de peixe, rica em ômega-3, e posteriormente induzidos à pancreatite aguda, estudamos a sobrevida e cinética de marcadores da resposta inflamatória sistêmica.

Neste cenário, a presente investigação atendeu a vertente contemporânea do uso de EL de OP como agente imunomodulador adjuvante e independente da indicação de terapia nutricional parenteral, capaz de disponibilizar ácidos graxos ômega-3 em curto espaço de tempo. Igualmente, nosso protocolo de estudo pretendeu contribuir com a informação inédita do efeito da infusão intravenosa de EL de OP para atingir concentrações plasmáticas e teciduais adequadas de ômega-3 previamente ao trauma inflamatório (PA).

A pancreatite aguda pode se apresentar como distúrbio leve e autolimitado ou sob a forma de doença mais grave e de evolução potencialmente fatal^{34,72,73}, alvo esta de cuidados médicos intensivos. Existem diversos modelos experimentais, invasivos e não-invasivos, para induzir PA⁴⁹⁻⁵¹. Em nosso estudo, optamos pelo modelo de infusão retrógrada de taurocolato de sódio a 3% no duto pancreático, reconhecido por bem representar a fisiopatologia da PA e desenvolver resposta inflamatória sistêmica grave e mensurável⁵²⁻⁵⁵. Sua eficiência foi comprovada por elevados níveis da amilase sérica, marcador de gravidade da lesão pancreática experimental, e por alterações histopatológicas pancreáticas, caracterizadas por edema, necrose, infiltrado inflamatório e hemorragia, presentemente identificados 2 horas após a indução de PA.

Inflamação faz parte do processo fisiológico de resposta do hospedeiro frente à lesão e infecção, e pode se manifestar por produção diferenciada de moléculas inflamatórias, como citocinas anti e pró-inflamatórias, eicosanoides, moléculas de adesão, entre outras^{3,4,27-30}.

Níveis séricos elevados de IL-6 foram correlacionados com pior escore de gravidade (Ranson e APACHE II) e maior tempo de permanência em Unidade de Terapia Intensiva em pacientes com pancreatite aguda grave^{73,74}. Das citocinas pró-inflamatórias produzidas na resposta inicial à pancreatite aguda, acredita-se que, em particular, TNF- α e IL-1 β , primariamente induzidas pela IL-6 e 8, sejam importantes na promoção da lesão tecidual local e na falência de órgãos^{28-30,34, 73-77}.

Nos achados experimentais de Frossard et al⁷⁸, a gravidade da pancreatite foi correlacionada diretamente com aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-1 β . Na presente investigação, duas horas após a indução de PA não houve diferença significativa na dosagem sérica de IL-1 β entre os diferentes grupos. O comportamento da cinética do TNF- α , nos grupos salina e sem infusão chamou nossa atenção. No período observacional inicial (duas horas), a dosagem de TNF- α foi significativamente maior em animais com pancreatite sob infusão intravenosa de solução salina, quando comparado ao grupo sem infusão intravenosa (SI). Doze horas pós- PA, o aumento desta citocina não foi identificado, no entanto, ao considerarmos a resposta cinética (2, 12 e 24 horas) após indução da PA em cada grupo, pudemos identificar o aumento significativo dos níveis de TNF- α nos grupos salina (SS) e sem infusão (SI) aos comparamos a progressão do período de 12 horas para 24 horas pós trauma.

A investigação cinética de citocinas inflamatórias no curso da pancreatite experimental também foi explorada por pesquisadores do LIM 37 HC-FMUSP. Em ratos submetidos à PA por injeção de taurocolato a 4% no duto biliar-pancreático sem tratamento, Meyer e colegas⁵² observaram a cinética da resposta pró-inflamatória considerando os tempos de 2, 12, 24 horas e de quinze dias. Ao contrário de nossos achados, os autores encontraram aumento significativo dos níveis séricos de TNF- α , IL-6 e IL-10 já no período de 2 horas após indução da doença e ausência de expressões significativas destas

citocinas nos períodos tardios de 24 horas e quinze dias pós-indução da lesão pancreática. Possivelmente, a maior dose de taurocolato utilizada por esses pesquisadores contribuiu para modulação mais precoce da resposta inflamatória à PA que aquela observada em nossa investigação. Nesse estudo, os autores sugerem que possa haver diferentes tempos de síntese e regulação de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α durante o curso da pancreatite experimental. A este respeito, os autores ⁽⁵²⁾ apontaram o expressivo aumento sérico de IL-6 no período de 12 horas pós PA como possível mediador da redução dos níveis de TNF- α após 24 horas da progressão da doença.

Em relação ao efeito cinético de EL de OP sobre concentrações sistêmicas de citocinas, encontrou-se, no presente estudo, diminuição significativa de interleucinas inflamatórias IL1- β e 6, redução de IL-4 e uma forte tendência no aumento sérico da citocina anti-inflamatória IL-10 ($p=0,06$), no período de 24h pós-indução de PA. Somado a estes resultados, encontramos aumento dos níveis séricos de TNF- α nos grupos salina e sem infusão, o qual não foi identificado no grupo OP. Esses achados sugerem que a infusão parenteral de EL de OP, anterior à indução experimental de pancreatite, pode modular favoravelmente a resposta inflamatória após 24 horas da lesão pancreática.

Nossas considerações são reforçadas pelo comportamento da razão IL-6/IL-10, nos três tempos pós-indução de PA (2, 12 e 24 horas). Observamos que os grupos de ratos infundidos com solução salina (SS) e, sem infusão (SI) apresentaram significativo aumento da razão IL-6/IL-10, que não aconteceu no grupo de animais infundidos com a EL rica em ômega-3. Este resultado torna-se de relevante interesse científico, uma vez que, a resposta inflamatória ao trauma agudo é caracterizada pela síntese precoce da IL-1 β e TNF- α , consideradas as principais responsáveis pela produção em cascata de outras citocinas como a IL-6, conhecida atualmente como uma das principais interleucinas responsáveis pela resposta inflamatória de fase aguda^{28-30,34,73-77}.

Nossos resultados, embora experimentais, concordam com os obtidos em estudos clínicos que avaliaram o efeito da prescrição parenteral de EL de OP na resposta inflamatória sistêmica da PA. Estudo aleatório duplo-cego, em pacientes com PA grave, a suplementação, por cinco dias de 0,15 a 0,2

g/kg/dia de óleo de peixe em solução de nutrição parenteral (NP) se associou à redução da resposta inflamatória expressa por menores níveis séricos de IL-6⁴⁴. Esses achados foram correlacionados com aumento do ácido graxo EPA no plasma e com a melhora do desfecho clínico dos pacientes, avaliados através da melhor taxa de oxigenação e diminuição de dias com terapia de substituição renal contínua⁴⁴.

Chamou nossa atenção que o grupo OP se diferenciou dos outros grupos ao apresentar a modulação favorável da resposta citocínica após 24 horas de indução da PA, enquanto nos períodos estudados precocemente (2 e 12 horas), as alterações do perfil sérico de citocinas não foram diferentes das encontradas em animais sob infusão de solução salina, exceto em relação a concentração de IL-2, que no período de 12 horas foi maior expresso no grupo OP12 em relação ao SI12, no entanto este achado não é encontrado no período de 24 horas pós-PA. Esta observação nos permite considerar a existência de vantagem tardia da infusão de OP na modulação da resposta de citocinas pró-inflamatórias.

Ainda no período de observação mais tardio da resposta inflamatória, a tendência de aumento da concentração de IL-10 observada no grupo OP24 quando comparada com o grupo OP12 ($p=0,06$), tem valor para futuros ensaios experimentais, para compreender seu papel na cinética inflamatória em resposta ao trauma agudo da pancreatite. O aumento sérico da interleucina 10 foi previamente correlacionada com a diminuição da gravidade em modelos experimentais de pancreatite aguda^{30,74-77}. No entanto, a afirmação destes achados é ainda controversa. Em estudo clínico aleatório duplo-cego, a dose única de solução recombinante de IL-10 suplementada em pacientes induzidos a pancreatite por ERCP, não apresentou efeito protetor em reduzir a incidência e a gravidade da doença⁷⁹.

A modulação favorável da resposta inflamatória sistêmica pode ser mediada pela expressão de proteínas de choque térmico, conhecidas como *heat shock protein* (HSP). Em sua maioria, as HSPs exercem efeito protetor contra o dano celular e sua expressão pode ser induzida por estresses fisiológicos que incluem alta temperatura, radicais livres, endotoxinas, infecção, inflamação aguda e autoimunidade⁸⁰⁻⁸⁶.

Em nossos resultados, todos os grupos experimentais apresentaram a diminuição significativa da expressão de HSP 70 no tecido pulmonar e hepático no período de 12 horas, o que contribui para sugerirmos o período de 12 horas pós-indução de pancreatite como importante período da resposta ao estresse em nosso modelo de estudo. A indução de HSP 70 em modelos experimentais de sepse e pancreatite aguda foi previamente correlacionada com a redução de marcadores de inflamação, com menores níveis plasmáticos de IL-1 β , 6 e TNF- α ⁽⁸⁷⁻⁹¹⁾. Nesse sentido, em nosso estudo a expressão HSP 70 não foi sensível às diminuições de IL-1 β e 6 e manutenção dos níveis de TNF-alfa observadas no período de 24 horas pós-PA nos animais tratados com EL de OP, já que todos os grupos experimentais tiveram aumento significativo similar da expressão de HSP 70 no tecido pulmonar e hepático no período tardio de 24 horas comparado com o tempo anterior de 12 horas.

Contudo, ao avaliarmos nossos grupos separadamente, por tempo e tipo de infusão, encontramos que a expressão inicial de HSP 70 no fígado foi significativamente menor no grupo infundido com OP, comparado ao grupo sem infusão. De forma interessante, no período consecutivo (12 horas), o grupo OP apresentou uma tendência no aumento da proteína 70 em relação aos grupos SS12 e SI12.

A indução precoce da expressão de HSP 70 vem sendo alvo terapêutico em pancreatite aguda experimental. HSP 70 foi induzida, em ratos, por meio de lavagem peritoneal com solução salina a 42° graus durante o período de 30 minutos, seguida por indução de lesão pancreática por injeção intraperitoneal de ceruleína⁹¹. Seis horas após a indução da PA, os autores observaram aumento da expressão de HSP70 no tecido pancreático, correlacionado com menores níveis séricos de amilase, IL-6, TNF- α e significativa redução de escore de gravidade histopatológica do pâncreas. Entretanto, clinicamente, a investigação de HSP 70 na patógenese da PA ainda foi pouco evidenciada.

A determinação tecidual de HSP 90 foi estudada por pesquisadores do LIM 51 do HC-FMUSP. Em seus achados, o aumento da expressão tecidual de HSP70 e 90 no período de 24 horas após a indução de PA a 2,5% foram relacionados à redução significativa da infiltração de neutrófilos no pulmão de ratos ⁽⁹²⁾. Em nossa investigação, a expressão de HSP 90 pulmonar e hepática

também foi estudada. No tecido pulmonar, duas horas pós PA, encontramos aumento significativo da HSP 90 no grupo OP em relação ao grupo sem infusão. Este resultado não foi persistente nos tempos consecutivos de 12 e 24 horas. No fígado, o aumento significativo da proteína HSP 90 aconteceu no período de 12 horas no grupo infundido com OP12, quando comparado aos grupos SS12 e SI12. Todavia, no período de 24 horas, apenas o grupo sem infusão mostrou o aumento significativo de HSP 90 hepática, quando comparada ao grupo sob solução salina, conforme apresentado na Tabela 5. Em concordância com HSP 70, na clínica, a expressão de HSP 90 na PA é pouco explorada.

A progressão da pancreatite aguda está associada com a intensidade da resposta inflamatória sistêmica. Em particular, a lesão pulmonar é complicação grave da progressão da PA e seu desenvolvimento e evolução incluem a participação das enzimas ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e lipo-oxigenase⁹²⁻⁹⁴. É sabido que após a ativação inflamatória, dependendo da composição lipídica da membrana celular, diferentes ácidos graxos são sintetizados através da atividade de enzimas fosfolipases e competem pela metabolização das vias ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase resultando na produção de prostaglandinas e leucotrienos da série par e ímpar. Em particular, prostaglandina da série par (PGE₂), tem demonstrado papel importante no controle da fase aguda da resposta inflamatória sistêmica³⁻⁶. Na pancreatite aguda, a inibição da produção de PGE₂, mostrou redução da intensidade da resposta inflamatória sistêmica e da gravidade da doença^{54,93,94}.

Em nossa pesquisa, identificamos aumento significativo de metabólito da enzima COX-2, a prostaglandina E₂ (PGE₂) no tecido pulmonar em todos os grupos estudados no período 24 horas pós-indução de PA, comparado ao período de 12 horas. Outro metabólito da COX-2, o tromboxano E₂ (TXB₂) não se alterou nos mesmos tempos de investigação, enquanto o metabólito da enzima lipooxigenase 15, conhecido como leucotrieno LTB₄, diminuiu significativamente entre os períodos de 12 e 24 horas, em todos os grupos de nossa investigação. Chama a atenção que os ácidos graxos ômega-3 disponibilizados por EL de OP, particularmente EPA, estão associados à inibição desses mediadores, o que parece não ter ocorrido na presente

pesquisa. No entanto, a interpretação destes resultados está prejudicada, parcialmente, por não termos analisado a concentração dos eicosanoides pulmonares no período precoce da indução de PA, representado pelo tempo de 2 horas.

Em semelhança com nosso estudo, Killian et al ⁽⁴¹⁾ observaram que, independente do aumento tecidual das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase, não houve diferenças significativas na concentração de prostaglandinas e leucotrienos pancreáticos entre ratos submetidos à PA e que receberam infusão parenteral de salina ou EL enriquecida com diferentes fontes de ácidos graxos, como n-6, n-9 e n-3. Os autores sugerem que o estudo de outras classes de prostaglandinas e leucotrienos é necessário para compreender o papel da suplementação de ômega-3 na PA experimental⁴¹.

A infusão parenteral EL de OP em pacientes cirúrgicos nos períodos pré, peri e pós-operatório parece diminuir significativamente os níveis de citocinas inflamatórias e síntese de eicosanoides derivados do ácido araquidônico (AG ômega-6)^{15-19,95-97}. Esses efeitos têm sido relacionados aos benefícios no desfecho clínico do doente. Paradoxalmente, em nossa pesquisa, não houve associação de modulação favorável de citocinas pró-inflamatórias com redução de eicosanoides derivados do ácido araquidônico (AA).

A concentração plasmática e tecidual de ácidos graxos ômega-3, EPA e DHA, e de ácido araquidônico foram investigados em nosso estudo. No plasma de ratos sacrificados 2 horas após a indução de pancreatite, encontramos aumento significativo da concentração de DHA nos grupos OP e SS. Em fragmentos pulmonares, encontramos maior presença de EPA e da razão EPA/AA, também nos grupos SS e OP. O aumento de EPA e DHA no grupo SS pode ser parcialmente explicado pelo fato de a ração oral padrão Quintia®, gratuitamente fornecida pela FMUSP e que foi ofertada em todo o período de nosso estudo, ser enriquecida com 0,19% de ácidos graxos ômega-3.

A presença de infiltrado inflamatório no pâncreas faz parte da avaliação histopatológica na pancreatite aguda experimental, conforme estabelecido pelo critério de Schmidt⁶⁷. Apesar da expressiva atividade de citocinas inflamatórias, especialmente no período de 12 horas pós-PA em todos os grupos, não

verificamos diferença significativa na manifestação inflamatória pancreática. Necrose e edema também são parâmetros utilizados para a avaliação histopatológica da pancreatite aguda. Em nossas análises, identificamos o aumento significativo de focos de necrose gordurosa e edema no grupo infundido com solução salina ao compararmos o intervalo cinético entre 2 e 12 horas pós PA do grupo.

Killian e colaboradores⁴¹ estudaram a suplementação da NP com diferentes emulsões lipídicas em ratos induzidos a pancreatite aguda grave por ceruleína. 24 horas após a indução, os animais foram sacrificados e a histologia pancreática analisada conforme critério estabelecido por Schmidt⁽⁶⁷⁾. Os animais tratados com EL de OP apresentaram redução significativa no escore total de gravidade histopatológica, quando comparado com grupos que receberam EL enriquecida com ácidos graxos ômega-6 e 9, embora não se encontrou alterações em necrose, infiltrado inflamatório e edema pancreáticos⁴¹. De forma diversa, em nosso estudo, os benefícios da histologia pancreática não foram associados ao tratamento com EL de OP. Porém, o fator limitante na interpretação de nossos resultados foi a ausência de análise histológica pancreática no período de 24 horas, já que a modulação do processo inflamatório por infusão de OP ocorreu neste período após indução de PA.

O estresse oxidativo também tem importância na patogênese da pancreatite aguda experimental e sua intensidade pode estar diretamente relacionada à gravidade da doença⁹⁸. Tem sido também considerado um fenômeno precoce no curso da PA experimental, caracterizado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, produtos de peroxidação lipídica e pela redução de enzimas antioxidantes teciduais^{99,100}. Malonaldeído (MDA), frequentemente medido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica^{99,100} e, em nosso estudo, a determinação de sua concentração foi analisada em fragmentos do tecido hepático nos períodos de 2 e 12 horas pós indução de PA.

Nossos achados não mostraram diferença significativa entre os grupos dos níveis hepáticos de MDA nos tempos de 2 e 12 horas. A análise cinética entre os dois períodos avaliados revelou que os grupos SS e SI tiveram

menores níveis de MDA no tempo de 12 horas, quando comparados com o período anterior de 2 horas. Não foi encontrada redução significativa na cinética dos níveis de MDA no grupo que recebeu infusão de OP.

Ácidos graxos ômega-3 são potencialmente associados ao estresse oxidativo, e por isso as EL que os contêm, como as de OP, conferem altas doses de vitamina E, conhecida por seu potencial antioxidante. Apesar dessa constatação, a resposta da suplementação de ômega-3 sobre a peroxidação lipídica tem sido contraditória em ensaios clínicos e experimentais. A suplementação de EPA e DHA pode resultar em menor resposta do estresse oxidativo,¹⁰⁰⁻¹⁰⁶ ou sua administração pode alterar favoravelmente a composição lipídica da membrana sem influenciar na síntese de peróxidos lipídicos plasmáticos e teciduais^{41,104-105}. Não obstante, a suplementação de ômega-3 mostrou-se atuar de forma diferente em alguns estudos e aumentou significativamente a taxa de peroxidação lipídica. A este respeito, Piche e colegas¹⁰⁷ reportaram aumento plasmático dos níveis de MDA, marcador de estresse oxidativo, em adultos saudáveis suplementados com óleo de fígado de bacalhau, rico em ácidos graxos ômega-3.

Na PA experimental, estudos são concordes com nossos achados em não evidenciar potencial efeito da EL de OP na redução de produtos de peroxidação lipídica. Em ratos induzidos a PA grave, aumento significativo de enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase no tecido pancreático após infusão intravenosa de EL de OP não foi correlacionado significativamente com a redução tecidual de TBARS⁴¹.

Cabe ressaltar que o tempo de observação da resposta oxidativa pode ter limitado a conclusão de nossos achados. Ao se retratar a resposta citocínica, o grupo OP no período de 12 horas pós-PA, representou maior o pico do quadro inflamatório no curso da PA induzida por taurocolato a 3%. Este dado se correlaciona às análises pulmonar e hepática da expressão de HSP 70 e 90, nas quais as proteínas de estresse agudo, conhecidas por conferir proteção tecidual a lesão, se encontraram reduzidas no tempo de 12 horas, comparado com os outros dois períodos do nosso estudo. Com base nestas observações, acredita-se que a dosagem dos níveis de MDA em período tardio da indução

de pancreatite poderiam apresentar-se diferentemente expressas dos tempos de 2 e 12 horas.

O tempo de sobrevida após a iniciação da pancreatite aguda é fator dependente da intensidade e gravidade da doença. A mortalidade geral encontrada por nós foi de aproximadamente 40%. Estudo realizado previamente no LIM 37 HC-FMUSP mostrou que ratos induzidos a pancreatite por taurocolato a 2,5% sem tratamento têm 35% de mortalidade até sete dias após indução do insulto pancreático⁵⁴.

Até onde sabemos, não existem informações sobre a redução de mortalidade com a suplementação parenteral de OP na pancreatite aguda experimental. Em nosso estudo não foi encontrada alteração significativa da sobrevida entre seus diferentes grupos, mas, de forma não significativa, o grupo suplementado com OP apresentou maior mediana de tempo de sobrevida (30 - 42 horas vs 24 - 48h em SS e 30 - 36 h para SI). Considerando-se que o efeito modulador de citocinas por EL de OP foi tardio (24 horas após PA), é possível que a mediana de sobrevida desse grupo tenha se favorecido pela menor mortalidade de animais a partir desse período (24 horas). No entanto, nossa análise estatística não conseguiu confirmar essa hipótese.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o uso parenteral isolado da EL de OP prévio ao insulto da pancreatite aguda pode modular favoravelmente a cinética da resposta inflamatória sistêmica, com redução sérica de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão tecidual de HSP 70 e 90, sem influenciar a síntese de eicosanoides pulmonares, modificação histopatológica e sobrevida. É possível, que a avaliação cinética com intervalos mais prolongados possa identificar com melhor nitidez o efeito da infusão pura de EL de OP no curso da patogênese da pancreatite aguda experimental.

7 CONCLUSÃO

---

7 CONCLUSÃO

Dada as condições da presente pesquisa, onde ratos foram previamente submetidos a infusão parenteral de EL de OP puro por 48 horas antes de indução de pancreatite aguda e avaliados na progressão cinética dos tempos de 2, 12 e 24 horas, podemos concluir que:

1. A indução de pancreatite aguda, sem infusão parenteral prévia, reduz manifestação sérica de marcador anti-inflamatório IL-10 e aumenta interleucinas inflamatórias (IL-2 e TNF- α) sem repercussão na histologia pancreática.
2. A infusão parenteral de salina prévia à indução de pancreatite aguda reduz manifestação sérica de marcador anti-inflamatório IL-10 e aumenta níveis de TNF- α ; com repercussão histológica pancreática.
3. A infusão parenteral de óleo de peixe reduz produção sérica de interleucinas potencialmente inflamatórias IL-1 β e IL-6, mas sem repercussão na histopatológica pancreática.
4. Ocorreu alteração da resposta cinética de HSP 70 e 90 nos tecidos pulmonar e hepático, independente da infusão ou não de salina ou de óleo de peixe.
5. A infusão parenteral de solução salina fisiológica e ou de emulsão lipídica de óleo de peixe não modifica a mortalidade neste modelo de pancreatite aguda experimental.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – Aprovação CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao
Departamento de Gastroenterologia

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU ad-referendum** em 20.03.12 a execução do subprojeto intitulado "**Efeito da administração parenteral de ácidos graxos ômega-3 sobre modulação da resposta inflamatória sistêmica, morbidade e mortalidade de ratos submetidos à pancreatite aguda.**", que será **tese de Mestrado** da aluna **Priscila Casarin Garla**, tendo como **orientador** o Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0266/09**, intitulado "**Efeito da administração parenteral de ácidos graxos ômega-3 e glutamina sobre modulação da resposta inflamatória sistêmica, morbidade e mortalidade de ratos submetidos à pancreatite aguda**", aprovado por esta CAPPesq em 15.04.09.

CAPPesq, 22 de Março de 2012.

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.2 ANEXO B – Protocolo utilizado para análise da concentração sérica de citocinas por plataforma Luminex

Noventa poços com filtro foram pré-umedecidos com tampão de lavagem e a solução foi aspirada dos poços usando sucção a vácuo (Millipore Corporation, Billerica, MA). Microesferas revestidas com anticorpos monoclonais específicos para as diferentes citocinas avaliadas foram adicionadas aos poços. Amostras e padrões (variando de 0,13 a 2.000 pg / mL para cada análise) foram pipetados nos poços e incubados *over night* a 4°C. Os poços foram lavados e aspirados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada à proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE), foi adicionada às microesferas e incubadas por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos foi adicionada, aos poços com as microesferas (mínimo de 100 por análise), uma solução tampão *sheath fluid* (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex 100™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA). As concentrações das amostras desconhecidas (antígenos nas amostras de FG) foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-Plex Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os níveis das citocinas foram expressos como quantidade total por sítio (pg / sítio).

8.3 ANEXO C – Critério de Schmidt

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

9 REFERÊNCIAS

---

9 REFERÊNCIAS

1. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*. 2001;286:944-53.
2. Waitzberg DL, Lotierzo PHP, Duarte AJS. Imunonutrição, em: Waitzberg DL - Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3ª Ed, São Paulo: Atheneu. 2000; 1511-38.
3. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.1999;2:105-7.
4. Furst P, Kuhn KS. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? *Clin Nutr*. 2000;19(1):7-14.
5. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:14-9.
6. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(1):343-8.
7. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*. 1999;45(1):7-17.
8. Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Helton WS. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res*. 1999;82:216-21.
9. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNFalpha transcription, *Am J Physiol*. 2003;284:84-9.
10. Zhao S, Joshi-Barve S, Barve LH, Chen. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr*. 2004;23:71-8.
11. Van der Meij BS, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Langius JA, Brouwer IA, van Leeuwen PA. n-3 PUFAs in cancer, surgery, and critical care: a systematic review on clinical effects, incorporation, and washout of oral or enteral compared with parenteral supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:1248-65.

12. Torrinhas R, Waitzberg D. Major abdominal surgery can lead to an excessive systemic inflammatory response, which in turn increases the risk of postoperative complications and multiple organ failure. *JPEN*. 2011;35:292-4.
13. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1321-8.
14. Morlion BJ, Torwesten E, Lessire H, Sturm G, Peskar BM, Fürst P, Puchstein C. The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma. *Metabolism*. 1996;45:1208-13.
15. Heller AR, Fischer S, Rossel T, Geiger S, Siegert G, Ragaller M, Zimmermann T, Koch T. Impact of n-3 fatty acid supplemented parenteral nutrition on haemostasis patterns after major abdominal surgery. *Br J Nutr*. 2002;87:S95–S101.
16. Schauder P, Rohn U, Schafer G, Korff G, Schenk HD. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and receptor expression by lymphocytes in the postoperative period. *Br J Nutr*. 2002;87:103–S110.
17. Weiss G, Meyer F, Matthies B, Pross M, Koenig W, Lippert H. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Br J Nutr*. 2002;87:S89–S94.
18. Heller AR, Rossel T, Gottschlich B, Tiebel O, Menschikowski M, Litz RJ, Zimmermann T, Koch T. Omega-3 fatty acids improve liver and pancreas function in postoperative cancer patients. *Int J Cancer*. 2004;111:611-6.
19. Ning-Ning Li, Yong Zhou, Xian-Peng Qin, Yi Chen, Dan He, Jin-Yan Feng, Xiao-Ting Wu. Does intravenous fish oil benefit patients post-surgery? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Nutrition*. 2014;33:226-39.
20. Weiss G, Meyer F, Matthies B, Pross M, Koenig W, Lippert H. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Br J Nutr*. 2002;87(1):89-94.
21. Manzanares W, Dhaliwal R, Jurewitsch B, Stapleton RD, Jeejeebhoy KN, Heyland DK. Parenteral Fish Oil Lipid Emulsions in the Critically Ill: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JPEN*. 2014;38:20-8.
22. Edmunds CE, Brody RA, Parrott JS, Stankorb SM, Heyland DK. The effects of different IV fat emulsions on clinical outcomes in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2014;42(5):1168-77.

23. Schauder P, Rohn U, Schafer G, Korff G, Schenk HD. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and receptor expression by lymphocytes in the postoperative period. *Br J Nutr.* 2002;87:103-10.
24. Palmer AJ, Ho CK, Ajibola O, Avenell A. The role of ω -3 fatty acid supplemented parenteral nutrition in critical illness in adults: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2013;41(1):307-16.
25. Bradley EL 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg.* 1993;(5):586-90.
26. Brivet FG. Scoring systems and severe acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 2000;28(8):3124-5.
27. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut.* 2000;47(4):546-52.
28. Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2008;57(2):259-67.
29. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.
30. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg.* 1998;175(1):76-83.
31. Lubianskii VG, Nasonov SV. Acute pancreatitis after resection of stomach for low duodenal ulcer. *Khirurgiya.* 2001;(3):8-11.
32. Howard TJ, Moore SA, Saxena R, Matthews DE, Schmidt CM, Wiebke EA. Pancreatic duct strictures are a common cause of recurrent pancreatitis after successful management of pancreatic necrosis. *Surgery.* 2004;136(4):909-16.
33. Simmons DT, Petersen BT, Gostout CJ, Levy MJ, Topazian MD, Baron TH. Risk of pancreatitis following endoscopically placed large-bore plastic biliary stents with and without biliary sphincterotomy for management of postoperative bile leaks. *Surg Endosc.* 2008;22(6):1459-63.
34. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2015; 10-2.
35. Disario JA, Freeman ML, Bjorkman DJ, Macmathuna P, Petersen BT, Jaffe PE, et al. Endoscopic balloon dilation compared with sphincterotomy for extraction of bile duct stones. *Gastroenterology.* 2004;127(5):1291-9.

36. Bailey AA, Bourke MJ, Williams SJ, Walsh PR, Murray MA, Lee EY, Kwan V, Lynch PM. A prospective randomized trial of cannulation technique in ERCP: effects on technical success and post-ERCP pancreatitis. *Endoscopy*. 2008;40(4):296-301.
37. Freeman ML, Disario JA, Nelson DB, Fennerty MB, Lee JG, Bjorkman DJ, et al. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective, multicenter study. *Gastr Endosc*. 2001;54(4):425-34.
38. Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, et al. Guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2002;2(6):565-73.
39. Mirtallo JM, Forbes A, McClave SA, Jensen GL, Waitzberg DL, Davies AR. International consensus guidelines for nutrition therapy in pancreatitis: Committee Pancreatitis Task Force. *JPEN*. 2012;36(3):284-91.
40. Killian M, Heukamp I, Gregor JI, Bretthauer C, Walz MK, Jacobi CA, et al. n-3, n-6, and n-9 polyunsaturated fatty acids which composition in parenteral nutrition decreases severity of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats? *Int J Colorectal Dis*. 2006;21:57-63.
41. killian M, Heukamp I, Gregor JI, Schimke I, Kristiansen G, Wenger FA. Fish oil, but not soy bean or olive oil enriched infusion decreases histopathological severity of acute pancreatitis in rats without affecting eicosanoid synthesis. *Inflammation*. 2011;21.
42. Foitzik T, Eibl G, Schneider P, Wenger FA, Jacobi CA, Buhr HJ. Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *JPEN*. 2002;26(6):351-6.
43. Xu QH, Cai GL, Lü XC, Hu CB, Chen J, Yan J. The effects of ω -3 fish oil lipid emulsion on inflammation-immune response and organ function in patients with severe acute pancreatitis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2012; 51:962-5.
44. Wang X, Li W, Li N, Li J. Omega-3 fatty acids-supplemented parenteral nutrition decreases hyperinflammatory response and attenuates systemic disease sequelae in severe acute pancreatitis: a randomized and controlled study. *JPEN*. 2008;32(3):236-41.
45. Xiong J, Zhu S, Zhou Y, Wu H, Wang H. Regulation of ω -3 fish oil emulsion on the SIRS during the initial stage of severe acute pancreatitis. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2009;29(1):35-8.
46. Lei QC, Wang XY, Xia XF. The role of omega-3 fatty acids in acute pancreatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*. 2015;(4),2261-73.

47. Jafari T, Feizi A, Askari G, Fallah AA. Parenteral immunonutrition in patients with acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr.* 2015;34(1):35-43.
48. Sharif S, Broman M, Babcock T, Ong E, Jho D, Rudnicki M, Helton WS, Espat NJ. A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPEN.* 2006;30(4):271-6.
49. Hue Su K, Cuthbertson C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB.* 2006;8:264-86.
50. Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Experimental model of acute pancreatitis. *British J Surgery.* 1994;81:1096-1103.
51. Rattner DW. Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31;6-9.
52. Meyer A, Kubrusly MS, Salemi VM, De Mendonça Coelho AM, Molan NA, Patzina RA, Machado MC, Mady C, D'Albuquerque LA, Jukemura J. Severe acute pancreatitis: a possible role of intramyocardial cytokine production. *JOP.* 2014;15(3):237-42.
53. 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):687-93.
54. Matheus AS, Coelho AM, Sampietre S, Patzina R, Jukemura J, Cunha JE, Machado MC. Effect of inhibition of prostaglandin E2 production on pancreatic infection in experimental acute pancreatitis. *HPB,* 2007;9(5):392-7.
55. 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):502-7.
56. Howard TJ, Moore SA, Saxena R, Matthews DE, Schmidt CM, Wiebke EA. Pancreatic duct strictures are a common cause of recurrent pancreatitis after successful management of pancreatic necrosis. *Surgery.* 2004;136(4):909-16.
57. Lo SS, Wu CW, Shen KH, Hsieh MC, Lui WY. Higher morbidity and mortality after combined total gastrectomy and pancreaticosplenectomy for gastric cancer. *World J Surg.* 2002;26(6):678-82.
58. Lima-Gonçalves E, Yamagushi N, Waitzberg DL, Mello Filho GB. Nutrição parenteral em ratos: aspectos técnicos. *Acta Cir Bras.* 1990;5:17-22.

59. Galizia MS, Alves CC, Tamanaha EM, Torrinhas RS, Leite FC, Neto AH, Gama-Rodrigues J, Waitzberg DL. A new swivel model for parenteral and enteral infusion in rats. *J Surg Res*. 2005;128(1):3-8.
60. 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.
61. Qin H, Benveniste EN. ELISA methodology to quantify astrocyte production of cytokines/chemokines in vitro. *Methods Mol Biol*. 2012;814:235-49.
62. Jamieson AD, Pruitt KM, Calwell RC. An improved amylase assay. *J Dental Res*. 1969;48:483.
63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
64. Yoshioka S, Mukae H, Ishii H, Kakugawa T, Ishimoto H, Sakamoto N, et al. Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts. *Life Sci*. 2007;80(20):1839-45.
65. Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly (ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. 2002;17(4):286-92.
66. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chemistry*. 1957;226:497-509.
67. Schmidt J, Rattner DW, Lewandowski R, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 1992;215:44-56.
68. Shirai T, Matsuzaki K, Kuzumoto M, Nagahisa K, Furusawa C, Shioya S, Shimizu H. Precise metabolic flux analysis of coryneform bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and verification by nuclear magnetic resonance. *J Biosci Bioeng*. 2006;(102):413-24.
69. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3- 900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
70. Pinheiro J, Bates D, Debroy S, Sarkar D. R Core Team (2014). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-117.
71. Berwick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 12: Survival analysis. *Crit Care*. 2004;8:389-94.
72. Warshaw, AL. Lowering the level of uncertainty in lat pancreatitis. *Gastroenterology*. 1987;93:1434-7.

73. Steer, ML. Classification and pathogenesis of pancreatitis. *Surg Clin North Am.* 1989;101:1701-9.
74. Abe R, Oda S, Shinozaki K, Hirasawa H. Continuous hemodiafiltration using a polymethyl methacrylate membrane hemofilter for severe acute pancreatitis. *Contrib Nephrol.* 2010;166:5-63.
75. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers and mediators. *Shock.* 2005;24:45-51.
76. Laveda R, Martinez J, Munoz C, Penalva JC, Saez J, Belda G, et al. Different profile of cytokine synthesis according to the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:5309-13.
77. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock.* 2005;24:45-51.
78. Frossard JL, Hadengue A, Spahr L, Morel P, Pastor CM. Natural history of long-term lung injury in mouse experimental pancreatitis. *Crit Care Med.* 2002;30:1541-6.
79. 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.
80. Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 2000;85:109-17.
81. Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition.* 2002;18:225-8.
82. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002;277:15028-34.
83. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* 1992; 267:21987-990.
84. McCormick PH, Chen G, Tierney S, Kelly CJ, Bouchier-Hayes DJ. Clinically relevant thermal preconditioning attenuates ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2003;109:24-30.
85. Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, Li Z, Ohashi PS. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat Med.* 2003;9:1469-76.
86. Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:55-63.

87. Bhagat L, Singh VP, Hietaranta AJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. Heat shock protein 70 prevents secretagogue-induced cell injury in the pancreas by preventing intracellular trypsinogen activation. *J Clin Invest.* 2000;106:81-9.
88. Bhagat L, Singh VP, Song AM, van Acker GJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology.* 2002;122:156-65.
89. Weber H, Wagner AC, Jonas L, Merkord J, Hofken T, Nizze H, Leitzmann P, Goke B, Schuff-Werner P. Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2000;45:2252-64.
90. Rakonczay Z, Jr., Takacs T, Mandi Y, Ivanyi B, Varga S, Papai G, Boros I, Lonovics J. Water immersion pretreatment decreases pro-inflammatory cytokine production in cholecystokininoctapeptide-induced acute pancreatitis in rats: possible role of HSP72. *Int J Hyperthermia.* 2001;17:520-35.
91. Meng K, Liu Q, Dou Y, Huang Q. Prior peritoneal lavage with hot 0.9 % saline induces HSP70 expression and protects against cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Mol Biol Rep.* 2013;40(2):1443-9.
92. Moretti AI, Rios EC, Soriano FG, de Souza HP, et al. Acute pancreatitis: hypertonic saline increases heat shock proteins 70 and 90 and reduces neutrophil infiltration in lung injury. *Pancreas.* 2009;38(5):507-14.
93. Shapiro, AC, Wu D, Meydani SN. Eicosanoid derived from arachidonic to eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferative response. *Prostaglandins.* 1993;45:229-40.
94. B VAN Ooijen, Kort WJ, Tinga CG, H Wilson, D L Westbroek. Significance of prostaglandin E2 in acute necrotising pancreatitis in rats. *Gut.* 1989;30:671-4.
95. Liang B, Wang S, Ye YJ, et al. Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2008;14(15):2434-9.
96. Zhu MW, Tang DN, Hou J, Wei JM, Hua B, Sun JH, Cui HY. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on elderly patients after colorectal cancer surgery. *Chin Med J Engl.* 2012;125(2):178-81.
97. Han YY, Lai SL, Ko WJ, Chou CH, Lai HS. Effects of fish oil on inflammatory modulation in surgical intensive care unit patients. *Nutr Clin Pract.* 2012;27(1):91-8.

98. Flaishon R, Szold O, Weinbroum AA. 2006. Acute lung injury following pancreas ischaemia-reperfusion: role of xanthine oxidase. *Eur J Clin Invest.* 2006;36:831-7.
99. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 1999;14;377(1):1-11.
100. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1989.
101. Bruna E, Petit E, Beljean-Leymarie M, Huynh S, Nouvelot A. Specific susceptibility of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid to peroxidation in aqueous solution. *Lipids.* 1989;24:970-5.
102. Vossen RC, van Dam-Mieras MCE, Hornstra G, Zwaal RFA. Differential effects of endothelial cell fatty acid modification on the sensitivity of their membrane phospholipids to peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995;52:341-7.
103. Calzada C, Vericel E, Lagarde M. Lower levels of lipid peroxidation in human platelets incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1127:147-52.
104. Calviello G, Palozza P, Franceschelli P, Bartoli GM. Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues. *Lipids.* 1997;32:1075-83.
105. Hansen JB, Berge RK, Nordoy A, Bonaa KH. Lipid peroxidation of isolated chylomicrons and oxidative status in plasma after intake of highly purified eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids. *Lipids.* 1998;33:1123-9.
106. Meydani M, Evans WJ, Handelman G. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol.* 1993;264:992-8.
107. Piche LA, Draper HH, Cole PD. Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil versus a concentrate of n-3 fatty acids. *Lipids.* 1988;23:370-1.

10 APÊNDICES

10.1 APÊNDICE A - Contemplação da Pesquisa – Bolsa Internacional de Estágio em Pesquisa – BEPE nº 2013/25796-2

VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2013/25796-2
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No Exterior / Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior / BEPE - Mestrado - Fluxo Contínuo
Situação	Encerrado
Vigência	19/05/2014 a 30/10/2014
Beneficiário	Priscila Casarin Garla
Responsável	Dan Linetzky Waitzberg
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Medicina/FM/USP
Área de Alocação de Recursos	Saúde

Folha de Despacho para Proposta Inicial - BEPE - Mestrado

Resultado

Concedido

10.2 APÊNDICE B - apresentação nacional e internacional do estudo

Congresso Americano: Apresentação de dois pôsteres no congresso da Sociedade Americana de Nutrição Clínica e Metabólica - ASPEN, realizado em Fênix – Arizona em Fevereiro de 2013.

Poster 1) *"Impact of prior use of parenteral omega-3 fatty acids and glutamine isolated and combined on survival in an experimental model of acute pancreatitis"*

Pôster 2) *"Impact of prior use of parenteral omega-3 fatty acids and glutamine isolated and combined in inflammatory response in an experimental model of Acute Pancreatitis"*

Congresso Brasileiro: Apresentação oral de destaque científico do trabalho “Efeito da infusão parenteral combinada de ácidos graxos ômega-3 e glutamina sobre sobrevida e estresse oxidativo em pancreatite aguda, estudo experimental”.

TL-22

**XX CONGRESSO BRASILEIRO DE
NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL**

VII Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica
III Congresso de Gastronomia Hospitalar
Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica Pediátrica
Congresso Brasileiro de Nutrição Esportiva
Encontro Mundial de Terapia Nutricional Prof. Dudrick

CENTRO DE CONVENÇÕES . RECIFE . PERNAMBUCO
1 a 4 . DEZEMBRO . 2013

REALIZAÇÃO:

Certificado

MENTÃO HONROSA

A Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral, no uso de suas atribuições,
concede menção honrosa a:

PRISCILA GARLA; RICARDO GARIB; DAN WAITZBERG

pela autoria do Tema Livre: **EFEITO DA INFUSÃO PARENTERAL COMBINADA DE ÁCIDOS
GRAXOS ÔMEGA-3 E GLUTAMINA SOBRE SOBREVIDA E ESTRESSE OXIDATIVO EM
PANCREATITE AGUDA: ESTUDO EXPERIMENTAL**

apresentado com destaque científico durante o XX Congresso Brasileiro de Nutrição
Parenteral e Enteral, realizado no período de 01 a 04 de dezembro de 2013, em Recife, PE.

Recife, 04 de dezembro de 2013

Odery Ramos Júnior
Presidente do Congresso

Dan Waitzberg
Presidente da Comissão Científica

Lúcio Flávio Andrade de Alencar
Presidente da Comissão Organizadora

CNA ID: 94224

Congresso Europeu: Apresentação de dois pôsteres no congresso da Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabólica – ESPEN, realizado em Genebra – Suíça em Setembro de 2014.

Pôster 1) Previous parenteral infusion of alanil-glutamine increases HSP 70 expression in lung and liver of rats submitted to acute pancreatitis

Pôster 2): Unexpected results of prior infusion of parenteral fish oil lipid emulsion in experimental acute pancreatitis

ESPEN 2014

**SPEEDY BADGE PRINTING
ON-SITE USE ONLY**

Please make sure the bar code is properly printed by comparing the electronic document with your printed copy.

Scan the following barcode to PRINT your badge ->

Registration number: ESPEN14-V824

Dear Ms Priscila GARLA

We thank you very much for your interest in the 36th ESPEN Congress and are pleased to confirm your registration to the Congress.

As a pre-registered delegate, we invite you to use the ESPEN "Speedy Badge Printing" Service to print your badge and receive your congress material quickly.

- To benefit from this complimentary service, please complete the following simple steps:
1. Please PRINT this document when receiving it and BRING it with you at the Congress venue.
  2. Upon arrival at the Congress Centre, GO TO the Self Printing stations.
  3. Once there, select an available Self Printing station in order to print your badge.

Support staff will be available at the Self Printing stations, should you need any assistance.

Please kindly note that you will receive the following items:

- Your badge
- All relevant vouchers and tickets
- Your badge holder
- Your lanyard