

Mariana Barreto Serra

Perfil inflamatório e caracterização de células peritoneais em modelo de pancreatite aguda

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

**São Paulo
2021**

Mariana Barreto Serra

Perfil inflamatório e caracterização de células peritoneais em modelo de pancreatite aguda

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Serra, Mariana Barreto
Perfil inflamatório e caracterização de células
peritoneais em modelo de pancreatite aguda /
Mariana Barreto Serra. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.
Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Descritores: 1.Pancreatite 2.Ceruleina 3.Ácido
taurocólico 4.Lavagem peritoneal 5.Citometria de
fluxo 6.Macrófagos peritoneais

USP/FM/DBD-256/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu pai *Luiz Henrique Muniz Serra*, por ter me ensinado que a honestidade é um dos maiores valores da vida e por ter me dado muita força para ir em busca de um sonho: o doutorado na FMUSP.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom e todo poderoso Deus, que não solta a minha mão
Ao São Miguel Arcanjo, companheiro em todas as batalhas
À minha família, pilar do meu desenvolvimento
Aos amigos, pelo apoio de sempre e por lembrarem-me que a vida pode e deve ser leve.

Aos mestres que passaram em minha vida, em especial ao professor Laudelino (em memória), por sempre ter me incentivado a estudar e por ter projetado credibilidade em minha trajetória. Sei que se ele estivesse entre nós, comemoraria esta conquista.
À prof.^a Dr.^a Marilene, prof. Dr. Romão, prof.^a Dr.^a Iracelle, prof.^a Dr.^a Selma e ao prof. Dr. Wermerson Assunção pelas parcerias, conselhos, incentivos e inspiração, essenciais à minha jornada acadêmica.

A todos os colaboradores do laboratório de Emergências Clínicas da FMUSP (LIM-51) pelos ensinamentos, pelo apoio diário e pelos cafés deliciosos (em especial Kelly, Suely, Thaís, Sr. Geraldo).

Em destaque agradeço a minha querida prof.^a Dr.^a Denise Frediani, pelo apoio em cada etapa da construção desta tese, desde a estruturação das hipóteses até os experimentos de muitas horas e escrita final. Dê, obrigada por não ter soltado a minha mão e por ter acreditado em mim desde nosso primeiro contato no LIM 51.

Aos Professores doutores Francisco Soriano e Hermes Barbeiro pelos ensinamentos e apoio.

Ao professor Doutor Marcel Cerqueira César, por ter depositado expectativas em nossas metodologias, pelo incentivo, ensinamentos e pelas contribuições nos artigos.

Ao meu orientador prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, por todo conhecimento compartilhado, pela oportunidade, e por ter iluminado e conduzido meus passos na elaboração desta tese.

À Faculdade de Medicina da USP, ao Departamento de Clínica Médica, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, aos representantes discentes, e à biblioteca da FMUSP, e ao CNPQ/CAPES muito obrigada!

EPIGRAFE

“E uma das condições necessárias a pensar certo é não estarmos demasiado certos de nossas certezas”

Paulo Freire

Esta tese 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. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Pancreatite aguda	17
1.2 Anatomia do pâncreas e fisiopatologia da pancreatite aguda	20
1.3 Pancreatite aguda experimental	22
1.3.1 Pancreatite aguda experimental por ceruleína	24
1.3.2 Ácido taurocólico e pancreatite aguda.....	25
1.4 O peritônio.....	26
1.5 “ <i>Step up approach</i> ”- Técnicas minimamente invasivas e lavagem peritoneal no contexto da PA grave.....	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MÉTODOS	33
3.1 Animais e descrição dos grupos experimentais.....	33
3.2 Indução da pancreatite aguda leve por ceruleína e grupos experimentais.....	33
3.3 Indução da pancreatite aguda por taurocolato de sódio 2,5% e grupos experimentais.....	34
3.4 Lavagem Peritoneal Contínua	35
3.5 Eutanásia e coleta de material biológico	36
3.6 Imunofenotipagem e citometria de fluxo.....	36
3.7 Quantificação de interleucinas por Milliplex	37
3.8 Dosagem de amilase no soro	38
3.9 Curva de sobrevivência	38

3.10 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Lavagem peritoneal após 4 horas de pancreatite aguda leve	39
4.2 Células presentes no lavado da PerC após 12 horas da PA leve em camundongos. .	39
4.3 Concentração de amilase no soro de animais com PA leve.	44
4.4 Perfil de citocinas inflamatórias na PerC e soro após 12 horas de PA leve.	45
4.5 Lavagem peritoneal contínua na pancreatite aguda grave	48
4.6 Curva de sobrevivência	49
4.7 Células presentes no lavado da PerC após 12 horas da PA grave em camundongos.	50
4.5 Concentração de amilase em animais com PA grave.	53
4.6 Perfil de citocinas inflamatórias na PerC e soro após 12 horas de PA grave.	54
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	62
6.1 Resumo gráfico	63
7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	64
REFERÊNCIAS	65

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BAs	Ácidos biliares
CA	Ácido cólico
Ca	Cálcio
CCK	Colecistocinina
CDCA	Ácido quenodeoxicólico
CID	Código internacional de doenças
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL-8	Quimiocina 8
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DLA	Ácido desoxicólico
DP	Diálise peritoneal
ER	Retículo endoplasmático
SBF	Soro fetal bovino
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Inositol-3-fosfato
IκB	Inibidor de kinase
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
KCl	Cloreto de potássio
LCA	Ácido litocólico
LPM	Large peritoneal macrophage
LPC	Lavagem peritoneal contínua
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NFκ-B	Fator nuclear kappa B
NK	Natural killer
PA	Pancreatite aguda

PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Phosphate Buffered Saline
PerC	Cavidade peritoneal
PFA	Paraformaldeído
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SC	Subcutânea
SDRA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SPM	Small peritoneal macrophage
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TRX	Theoredoxina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Grupos experimentais e esquema de indução da pancreatite aguda por ceruleína.** Controle (CTL) - recebeu 0,1 mL de solução salina 0,9% via subcutânea (SC); pancreatite aguda- ceruleína (PA^{CER}) e pancreatite aguda ceruleína+lavagem (PA^{CER}+LV) receberam seis injeções (SC) da solução de ceruleína em intervalos de 1h cada e uma última injeção na mesma concentração, intravenosa (veia da cauda). Antes que se completassem as sete injeções, parte dos animais PA^{CER} escolhidos aleatoriamente passaram por uma lavagem peritoneal e foram denominados PA^{CER}+LV..... 34
- Figura 2. Esquema da indução de pancreatite aguda grave por taurocolato de sódio a 2,5% em camundongos C57BL/6.** (A) vesícula biliar; (B) ducto pancreobiliar; (C) ducto pancreático; (D) veia porta; (E) clipe de microvaso; (F) local de punção (agulha fixada em tubo de polietileno e conectada a bomba de infusão); (G) fixação temporária da agulha no ducto pancreobiliar..... 35
- Figura 3. Lavagem peritoneal contínua.** (A) PBS1X em banho maria 37°C; (B) bomba de infusão constante 500µL/ min por 30 min; (C) cateter 22G (entrada de PBS); (D) cateter 20G (saída); (E) suspensão de células coletadas (ilustração). 36
- Figura 4. Percentual de macrófagos, neutrófilos e linfócitos B e T presentes na cavidade peritoneal (PerC) dos grupos CTL e AP^{CER} após a quarta injeção de ceruleína (100µg/Kg) subcutânea.** Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos celulares foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 macrófagos, linfócitos B e linfócitos T ≠ neutrófilos; #p<0,05 macrófagos e linfócitos B ≠ linfócitos T. 39
- Figura 5. Células totais x 10⁵/mL presentes na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100µg/Kg).** Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 se PA^{CER}+LV ≠ CTL; #p<0,05 PA^{CER}+LV ≠ PA^{CER}. 40
- Figura 6. Percentual diferencial de macrófagos na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100µg/Kg).** (a) dot plot representativo de macrófagos LPM no Grupo PA^{CER}; (b) dot plot representativo de macrófagos SPM no Grupo PA^{CER}+LV; (c) macrófagos (d) LPM (F4/80^{high} CD11b^{high}); (e) SPM (F4/80⁺ CD11b⁺). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de

pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou $PA^{CER+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 41

Figura 7. Percentual diferencial dos linfócitos B presentes na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100 μ g/Kg). (a) linfócitos B (CD19⁺); (b) linfócitos B1(CD19⁺ CD11b⁺) ; (c) linfócitos B2 (CD19⁺ CD11b^{neg}); (d) linfócitos B1a (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁺); (e) linfócitos B1b (CD19⁺ CD11b⁺ CD5^{neg}) . As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou $PA^{CER+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 43

Figura 8. Percentual diferencial das células presentes na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100 μ g/Kg). (a) linfócitos T; (b) linfócitos NK; (c) neutrófilos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou $PA^{CER+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 44

Figura 9. Concentração de amilase (u/dL) no soro dos animais após 12h de PA. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se $PA^{CER} \neq CTL$; # $p < 0,05$ se $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 45

Figura 10. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA leve. A1- IL-1 β PerC, A2- Soro; B1- IL-4 PerC, B2-Soro; C1- TNF- α PerC, C2-Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou $PA^{CER+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 46

Figura 11. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA leve. A1- IL-6 PerC, A2- Soro; B1- MCP-1 PerC, B2-Soro; C1- MIP-2 PerC, C2-Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou $PA^{CER+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 47

Figura 12. Concentração de IL-10 (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA leve. A1- IL-10 PerC, A2-Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou $PA^{CER+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{CER+LV} \neq PA^{CER}$ 48

Figura 13. Percentual de macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T presentes na cavidade peritoneal (PerC) uma hora após a indução da PA por ácido taurocólico 2,5% intraducto pancreático. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos celulares foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 linfócitos B ≠ macrófagos, neutrófilos e linfócitos T; #p<0,05 macrófagos ≠ neutrófilos.	49
Figura 14. Percentual de sobrevivência dos animais dos grupos PA^{AT} e PA^{AT}+LV acompanhados por 16h após indução da PA grave. A sobrevivência foi de 100% no grupo PA ^{AT} +LV (n=9) enquanto no grupo PA ^{AT} (n=7) todos os animais vieram à óbito. Log-rank (Mantel-Cox) Test, *p<0,05	50
Figura 15. Percentual diferencial de macrófagos presentes na PerC após 12h de PA grave induzida por ácido taurocólico 2,5%. (a) “Small peritoneal macrophage”-SPM (CD11b+ F4/80+); As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One- 51	
Figura 16. Percentual diferencial das linfócitos B presentes na PerC após 12h de PA grave induzida por ácido taurocólico 2,5%. (a) B (CD19⁺); (b) B1 (CD19⁺ CD11b⁺); (c) B2 (CD19⁺ CD11b^{neg}); (d) B1a (CD19⁺ CD11b⁺CD5⁺); (e) (CD19⁺ CD11b⁺CD5^{neg}). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 PA ^{AT} ≠ CTL; #p<0,05 PA ^{AT} +LV ≠ PA ^{AT}	52
Figura 17. Percentual diferencial de células presentes na PerC após 12h de PA grave induzida por ácido taurocólico 2,5%. (a) Linfócitos T (CD3⁺ CD4⁺); (b) Linfócitos NK (CD49b⁺); (c) neutrófilos (Ly6G⁺ F4/80^{neg}). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 PA ^{AT} ≠ CTL; #p<0,05 PA ^{AT} +LV ≠ PA ^{AT}	53
Figura 18. Concentração de amilase (u/dL) no soro dos animais após 12h de PA. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 se PA ^{AT} ≠ CTL; #p<0,05 PA ^{AT} +LV ≠ PA ^{AT}	54
Figura 19. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA grave. (A1) IL-6 PerC, (A2) IL-6 Soro; (B1) MIP-1 PerC, (B2) MIP-1 Soro; (C1) MIP-2 PerC, (C2) MIP-2 Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 PA ^{AT} ≠ CTL; #p<0,05 PA ^{AT} +LV ≠ PA ^{AT}	56

Figura 20. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA grave. (A1) MCP-1 PerC, (A2) MCP-1 Soro; (B1) IL-10 PerC, (B2) IL-10 Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{AT} e/ou $PA^{AT+LV} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{AT+LV} \neq PA^{AT}$ 57

Figura 21. Resumo gráfico dos efeitos da lavagem peritoneal na PA leve e grave. (a) Esquema representativo da lavagem peritoneal contínua; **(b)** suspensão de células; **(c)** macrófago SPM; **(d)** Aumento de SPM e parâmetros inflamatórios na PerC do grupo PA^{CER+LV} após 12 horas de PA leve; **(e)** Redução de SPM e parâmetros inflamatórios na PerC do grupo PA^{AT+LV} após 12 horas de PA grave; **(f)** 100% de sobrevida dos animais do grupo PA^{AT+LV} 63

Resumo

Serra MB. *Perfil inflamatório e caracterização de células peritoneais em modelo de pancreatite aguda* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A pancreatite aguda (PA) é uma condição inflamatória do pâncreas mais comumente causada por cálculos biliares ou uso excessivo de álcool; na maioria dos pacientes, a doença tem um curso leve ou moderado, mas em situações mais graves, onde há necrose de tecido pancreático, a taxa de mortalidade pode atingir índices alarmantes. A lavagem peritoneal contínua (LPC) é uma abordagem para tratar pancreatite aguda necrotizante (grave), pois remove toxinas e reduz distúrbios metabólicos graves, mas ainda são desconhecidos seus efeitos sobre a pancreatite aguda leve e sobre o conteúdo de células peritoneais durante a PA leve e grave, uma vez que a inflamação é um fator importante na progressão da doença. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da lavagem peritoneal na dinâmica de células peritoneais durante a pancreatite aguda leve e grave em camundongos. Para isso, utilizamos camundongos C57Bl/6 (n=6-10/grupo) tanto para a indução da PA leve por um modelo de estimulação da secreção pancreática com doses supramáximas de ceruleína (100 µg/Kg) quanto para o modelo de PA grave por injeção de ácido taurocólico (2,5%) intraducto pancreático. Após 4 horas de PA leve e 1h de PA grave, parte dos animais passaram pela LPC de 30 min., e foi feita a caracterização das células presentes no líquido obtido do procedimento utilizando a técnica de imunofenotipagem e citometria de fluxo. Após 12 horas da indução da PA nos dois modelos, foi realizada uma nova caracterização celular no lavado peritoneal e dosagens de citocinas inflamatórias no lavado e no soro e amilase no soro. Verificamos que nas primeiras 12 horas de PA leve não há alteração no conteúdo de células peritoneais quando comparado a um animal sem pancreatite, mas houve mudança no fenótipo dos macrófagos dos animais lavados, tal como maior produção de citocinas inflamatórias e IL-4. A concentração de amilase no soro estava reduzida nesses animais. No modelo de PA grave, durante a lavagem, já na primeira hora de PA, havia diferença na proporção e fenótipo de macrófagos da cavidade peritoneal (PerC). Após 12 horas verificou-se redução de macrófagos nos animais lavados, tal como de citocinas inflamatórias. A lavagem peritoneal reduziu a concentração de amilase no soro desses animais e proporcionou uma sobrevida de 100% nos animais com PA grave que passaram pelo procedimento. Assim, a lavagem peritoneal pode ser uma alternativa muito útil no manejo da PA em estágios mais graves, quando já é possível notar alterações na composição celular da PerC.

Descritores: Pancreatite; Ceruleína; Ácido taurocólico; Lavagem peritoneal; Citometria de fluxo; Macrófagos peritoneais.

Abstract

Serra MB. *Inflammatory profile and characterization of peritoneal cells in acute pancreatitis model* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory condition of the pancreas most commonly caused by gallstones or excessive alcohol use; in most patients, the disease has a mild or a moderate course, but in more severe situations, where there is necrosis of the pancreatic tissue, the mortality rate can reach alarming rates. Continuous peritoneal lavage (CPL) is an approach to treating acute necrotizing (severe) pancreatitis as it removes toxins and reduces severe metabolic disturbances, but its effects on mild acute pancreatitis and on peritoneal cell content during mild and severe AP are still unknown. Thus, the aim of this work was to evaluate the effects of peritoneal lavage on the dynamics of peritoneal cells during mild and severe acute pancreatitis in mice. For this, we used C57Bl/6 mice (n=6-10/group) for both protocols; mild AP induction by a model of stimulation of pancreatic secretion with supramaximal doses of cerulein (100 µg/Kg) and for the severe AP model by injection of taurocholic acid (2.5%) into the pancreatic duct. After 4 hours of mild AP and 1h of severe AP, part of the animals underwent a 30-min CPL, and the characterization of cells present in the liquid obtained from the procedure was performed using the technique of immunophenotyping and flow cytometry. After 12 hours of AP induction in both models, a new cellular characterization was performed in the peritoneal lavage, such as measurement of inflammatory cytokines in the lavage and in the serum and amylase in the serum. We found that in the first 12 hours of mild AP there is no change in the content of peritoneal cells when compared to an animal without pancreatitis, but there was a change in the phenotype macrophages, such as increased production of inflammatory cytokines and IL-4. However, the serum amylase concentration was reduced in these animals. In the severe PA model, during CPL, within the first hour of AP, there was a difference in the proportion and phenotype of peritoneal cavity (PerC) macrophages. After 12 hours there was a reduction of macrophages in the CPL animals, as well as of inflammatory cytokines. Continuous peritoneal lavage reduced the concentration of amylase in the serum of these animals and provided 100% survival in animals with severe AP that underwent the procedure. Thus, peritoneal lavage can be a very useful alternative in the management of AP in more severe stages, when it is already possible to notice changes in the cellular composition of PerC.

Descriptors: Pancreatitis; Cerulein; Taurocholic acid; Continuous peritoneal lavage; Flow cytometry; Peritoneal macrophages.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pancreatite aguda

A pancreatite é definida como um processo inflamatório do pâncreas, caracterizado pela ativação prematura de enzimas digestivas dentro das células acinares pancreáticas, causando autodigestão do órgão e dano celular com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, formação de edema e recrutamento de células imunológicas ¹. A pancreatite aguda (PA) é uma condição inflamatória do pâncreas mais comumente causada por cálculos biliares ou uso excessivo de álcool. Na maioria dos pacientes, a doença tem um curso moderado, onde a ressuscitação fluídica moderada, o controle da dor e da náusea resultam em melhora clínica rápida ².

Uma revisão sistemática de Xiao et al. (2016), avaliou dados epidemiológicos relacionados à prevalência global de PA, reunindo estudos de alta qualidade especificamente estudos de coorte de base populacional realizados em populações em geral. Este artigo relatou que a incidência global combinada de pancreatite aguda é de 34 casos (intervalo de confiança de 95% (IC) 23-49) por 100.000 habitantes por ano, sem diferença estatística significativa entre homens e mulheres. Já a mortalidade combinada de um episódio de pancreatite aguda em sete estudos de coorte de base populacional avaliados na revisão sistemática de Xiao et al. foi de 1,16 (95% CI 0,85-1,58) por 100.000 habitantes por ano ³.

Um estudo europeu mostrou que o cálculo biliar é a etiologia dominante no sul da Europa e o álcool na Europa oriental, com proporções intermediárias na Europa do norte e ocidental. Pesquisas que investigam o padrão socioeconômico do consumo nocivo de álcool também destacam que grupos de baixo nível socioeconômico consomem essas bebidas em maior quantidade, consistente com os dados de que a PA alcoólica está fortemente ligada à privação social ^{4,5}. Um estudo conduzido em Shanghai, no leste da China, verificou que os pacientes com PA nas áreas urbanas e suburbanas aumentaram de 125 e 116 em 2011 para 179 e 274 em 2016, respectivamente; e que houve aumento anual em ambas as áreas, mas a taxa de crescimento na área suburbana foi superior à da área urbana ⁶.

Na Jamaica, um estudo de coorte retrospectivo (2006-2012) mostrou que a incidência de PA foi de 74 / 100.000 internações hospitalares anualmente. A maioria dos casos tratava-se de pancreatite biliar; 12,2% do total de casos atendidos foram classificados como graves e a taxa de mortalidade foi de 2% ⁷.

Entre 2001 a 2014, foram estimadas 2.368.780 hospitalizações nos Estados Unidos com diagnóstico de alta de PA. Em relação à etiologia destas internações, 527.653 (22,5%) foram por abuso de álcool, 533.253 (22,7%) tinham cálculos biliares, 83.836 (3,7%) hipertrigliceridemia e 70.199 (3,0%) apresentavam mais de um desses diagnósticos; as 1.134.428 (48,3%) internações restantes não tiveram nenhum dos diagnósticos supracitados. O custo médio dos hospitais (em dólares americanos de 2014) mostrou uma tendência não linear, pois passou de US \$ 6820 em 2001 para US \$ 7602 em 2007 e depois reduziu para \$ 6766 em 2014 ⁸.

No Brasil, dados do IBGE e DATASUS apontam para uma média de 19 casos para cada 100.000 habitantes, com 2.538 internações hospitalares entre 2015 e 2016, sendo que 5,24% destes vieram a óbito, responsável por um custo de aproximadamente 2 milhões de reais ^{9,10}. Um estudo descritivo de pacientes diagnosticados com pancreatite aguda e crônica no Conjunto Hospitalar de Sorocaba, São Paulo analisou 39 prontuários, que cobriram todos os casos de pancreatite de junho de 2013 a junho de 2014. Foram encontrados 26 casos de pancreatite aguda e 4 de crônica. A etiologia biliar respondeu por 50,0% dos casos, seguida por alcoólica (26,7%) e idiopática (13,3%). Dos pacientes estudados, 3 evoluíram a óbito, sendo que um dos casos a morte se deu 3h após o paciente dar entrada no serviço ¹¹. Um estudo observacional, retrospectivo e transversal, realizado em um serviço público de urgência e emergência na cidade de São Luís, Maranhão, identificou que nos 40 prontuários analisados, a etiologia por abuso de álcool foi a mais comum com 35% dos casos, seguida de colelitíase (27,5%). A média de idade foi de 46,7 anos, e a mortalidade foi de 20% ¹².

A avaliação de pacientes com PA é complexa, pois trata-se de uma doença que possui etiologia, forma de apresentação clínica, aspecto anatomopatológico e tratamento variáveis. Os casos mais graves de pancreatite aguda, que compreendem cerca de 20 a 30% dos pacientes, representam elevado risco de vida, com taxas de mortalidade hospitalar de cerca de 15% ¹³; outras complicações incluem síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse e síndrome da dificuldade respiratória aguda (SDRA). A classificação mais utilizada para pancreatite aguda baseia-se na revisão de 2012 da classificação Atlanta e em definições resultantes de consenso internacional ¹⁴. Esse sistema de classificação identifica dois estágios da doença: precoce e tardio. Quanto à gravidade, pode ser classificada como leve, moderada ou grave. A forma leve (pancreatite edematosa intersticial) não apresenta insuficiência de órgãos, complicações locais ou sistêmicas e geralmente se resolve na primeira semana. Se houver insuficiência de órgãos transitória (menos de 48 h),

complicações locais ou exacerbação da doença comórbida, ela é classificada como moderada. Pacientes com insuficiência orgânica persistente (mais de 48 h) têm a forma grave da doença ¹⁴.

Em torno de 20 a 40% dos pacientes com pancreatite aguda grave apresentam infecção da necrose pancreática e peripancreática, considerada de mau prognóstico por ser responsável pela piora das funções orgânicas. Em uma revisão sistemática e metanálise, totalizando 6970 pacientes, a taxa de mortalidade em pacientes com necrose e insuficiência de órgãos infectados foi de 35,2%, enquanto que a necrose estéril concomitante a insuficiência de órgãos foi associada a uma mortalidade de 19,8%. Se os pacientes tivessem necrose infectada sem insuficiência de órgãos, a mortalidade seria de 1,4% ¹⁵.

Atualmente, várias tendências no manejo da pancreatite aguda grave mudaram as práticas clínicas; alimentação enteral precoce, papel seletivo dos antibióticos profiláticos, evitando cirurgia em pacientes com necrose estéril, abordagem mais conservadora à necrose infectada com intervenção tardia, seja endoscópica ou cirúrgica, e tratamento da pancreatite biliar. Apesar das melhorias no acesso às técnicas de cuidados, diagnóstico por imagens e intervenções, a pancreatite aguda continua a ser associada a morbidade e mortalidade significativas ¹⁶. Além disso, não existe terapia farmacológica disponível para atenuar a doença e seu curso, e o manejo do paciente com PA consiste em medidas de suporte, ainda que em casos de insuficiência orgânica concomitante ¹⁷.

Um estudo publicado recente na revista *Nature* discute o conceito de prevenção holística da pancreatite e postula que estratégias de prevenção primária, secundária e terciária precisam ser sistematicamente empregadas para diminuir os efeitos da pancreatite, uma vez que a PA (incluindo sua forma não necrotizante) leva a várias sequelas muito tempo após a resolução clínica e, portanto, não deve mais ser considerada uma doença autolimitada ¹⁸. Casos graves de PA que envolvem necrose com suspeita de infecção, adota-se um mecanismo tradicional de manejo: necrosectomia aberta, assim é possível remover completamente o tecido necrótico infectado. No entanto, essa abordagem invasiva está associada a elevados índices de complicações (34 a 95%) e morte (11 a 39%), com risco de insuficiência pancreática a longo prazo. Baseado no conceito de prevenção, mas voltado para redução do risco de mortalidade em uma fase mais tardia da PA aguda, técnicas menos invasivas, incluindo drenagem percutânea ¹⁹ drenagem endoscópica (transgástrica) ²⁰ e necrosectomia retroperitoneal minimamente invasiva, são cada vez mais frequentes em uso ²¹⁻²³. Essas técnicas podem ser realizadas em uma estratégia chamada *step-up*. Em

comparação com a necrosectomia aberta, a abordagem *step-up* visa inicialmente controlar a fonte de infecção, ao invés da remoção completa do tecido necrótico infectado, assim reduzindo a inflamação e o dano tecidual; posteriormente, havendo necessidade, procede-se à remoção do tecido necrótico²⁴. Um estudo publicado em 2010 no periódico *New England Journal of Medicine* mostrou que o uso da técnica em pacientes que tiveram pancreatite necrotizante (com confirmação ou suspeita de infecção secundária), reduziu a taxa de complicações graves ou morte, bem como complicações de longo prazo, reduzindo assim a utilização de recursos de saúde e custos totais. Com esta estratégia, mais de um terço dos pacientes foram tratados com sucesso apenas com drenagem percutânea, não necessitando de grande cirurgia abdominal²⁵.

Levando em consideração a incidência de PA e os custos com internações hospitalares, faz-se necessário compreender os mecanismos fisiopatológicos, tal como revisar as estratégias de manejo de pacientes com PA leve e grave, a fim de evitar ou reduzir complicações orgânicas no curso da doença.

1.2 Anatomia do pâncreas e fisiopatologia da pancreatite aguda

O pâncreas está localizado no abdome superior atrás do estômago e assume parte da função do sistema gastrointestinal por produzir e secretar enzimas digestivas no intestino, mas também é um órgão endócrino, que produz e secreta hormônios no sangue para controlar o metabolismo e armazenamento de energia em todo o corpo²⁶.

O pâncreas exócrino produz precursores de enzimas digestivas na forma inativa (ex. tripsinogênio, quimiotripsinogênio e procarboxipeptidase, que ficam armazenadas em uma membrana, formando o grânulo de zimogênio²⁷. A glândula exócrina normalmente é capaz de se proteger, mantendo as enzimas na sua forma inativa (zimogênio), mas quando exposta à lesão tecidual, ocorre ativação precoce do tripsinogênio em tripsina nas células acinares, com consequente ativação de demais enzimas digestivas, ocasionando autodigestão pancreática^{28,29}. Uma outra via que contribui para os danos inflamatórios da PA é a sobrecarga de cálcio intracelular nas células acinares induzida por várias toxinas, incluindo efeito dos ácidos biliares e dos metabolitos oxidativos e não-oxidativos do álcool; essa condição leva a disfunção mitocondrial e falha na produção de adenosina trifosfato tendo como consequência a morte celular pela via necrótica^{30,31}.

Após o dano pancreático inicial, ocasionado pela ativação prematura de enzimas digestivas da célula acinar, a progressão da doença ocorre em várias fases, iniciando pela

inflamação do pâncreas, seguida de resposta inflamatória generalizada e do estágio final da sepse³², tendo como consequência disfunção orgânica em pacientes com doença grave³³.

O aumento da pressão no interior do ducto pancreático, estimula o receptor de pressão da membrana da célula acinar (Piezzo-1) induzindo ao aumento do Ca²⁺ intracelular ativação enzimática e a ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear- kappa B (NFκ-B)^{34, 35, 36}. Os sinais gerados pelo NF-κB são capazes de produzir um grande número de fatores inflamatórios, como fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina (IL) -1β, IL-6 e proteína quimiotáctica de monócitos (MCP-1)^{35,37,38}.

O TNF- α contribui para a morte celular acinar pancreática e para a expressão de outros fatores proinflamatórios durante a PA, como IL-1, IL-6 e IL-8 que estimulam a migração de leucócitos no pâncreas e nos tratos intestinais, amplificando a resposta inflamatória³⁹. Foi relatado que pacientes com pancreatite aguda apresentam no soro concentrações elevadas de IL-6, quando comparados a indivíduos saudáveis. A desregulação de IL-6 na pancreatite, sugere que a mesma pode ser um marcador precoce da gravidade da doença⁴⁰.

Recentemente, foi mostrado que IL-1β pode induzir a ativação da tripsina, além de reduzir a viabilidade das células acinares pancreáticas e que esses efeitos são piorados por alterações no cálcio intracelular. Assim, a via de sinalização de Ca²⁺ pode ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento da pancreatite³⁹. Um estudo mostrou que camundongos deficientes do gene que codifica o receptor de IL-1 (IL-1R) ou em tratamento com o antagonista do receptor de IL-1 (rhIL-1Ra) atenuou a pancreatite crônica induzida por ceruleína⁴¹. A ceruleína é um secretagogo análogo à colecistoquina endógena e tem sido muito utilizada para indução de pancreatite crônica e aguda leve em roedores⁴².

IL-8, ou CXCL8, atua como um potente quimioatraente de neutrófilos. Complicações sistêmicas da pancreatite aguda estão associadas com a elevação de IL-8⁴³, tal como a gravidade da pancreatite aguda foi associada com o polimorfismo do gene de IL-8⁴⁴.

IL-10 reduz o dano pancreático e exibe ações anti-inflamatórias principalmente através da inibição de IL-1β e TNF-α³⁶. IL-10 é produzida por células imunes, como os macrófagos, células T regulatórias e linfócitos B⁴⁵. Camundongos com deficiência no gene de IL-10 mostraram maior resposta inflamatória e lesão pulmonar durante a pancreatite aguda e crônica^{46,47}.

Os vários tipos de citocinas podem atuar em uma superfície celular com receptores específicos e/ ou estimular enzimas como a ciclooxigenase-2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que medeiam o processo inflamatório. Espécies de oxigênio reativo (ROS) e espécies de nitrogênio reativo (RNS) também foram implicados na patogênese de pancreatite aguda, atuando por um duplo mecanismo: ROS e RNS atuam diretamente em biomoléculas (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) e oxidam esses componentes da membrana celular no pâncreas, levando a desintegração da membrana e necrose de células pancreáticas. Além do prejuízo direto pelos efeitos oxidativos, ROS e RNS também podem servir como mensageiros secundários na sinalização intracelular e induzir cascatas pró inflamatórias ⁴⁸.

A circulação de tripsina e DAMPs (Padrões moleculares associados à danos) podem levar a danos sistêmicos no vaso e danos de leves a moderados das mucosas intestinais resultando em síndrome de vazamento capilar, falência respiratória e síndrome compartimental abdominal ⁴⁹. O dano da barreira intestinal pode causar a translocação bacteriana ou a circulação sistêmica de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's), reativando o sistema imune e tornando as complicações sistêmicas exacerbadas, como a Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) ^{17,50}.

1.3 Pancreatite aguda experimental

Os modelos experimentais de pancreatite aguda são importantes para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos da doença, e têm-se optado pela padronização desses modelos em animais por ser reprodutível (principalmente quando se trabalha com espécies isogênicas) e pela facilidade de acesso ao pâncreas e demais órgãos, comparado a humanos ⁵¹. No entanto, para conduzir uma pesquisa experimental com pâncreas animal é importante considerar que existem algumas diferenças em relação aos humanos ⁵². A principal diferença entre o pâncreas humano e o pâncreas de rato/ camundongo é que, em humanos, os ductos biliar e pancreático são separados e normalmente formam um canal comum muito curto na parede duodenal, enquanto os do rato/camundongo formam um canal comum longo com a vesícula biliar, servindo também como canal de suco pancreático. Além disso, o pâncreas de ratos/ camundongos é composto por múltiplos segmentos na forma de um omento, enquanto o pâncreas humano é um único órgão sólido adjacente à parede duodenal. Apesar dessas diferenças, o pâncreas destes roedores também compartilha muitas semelhanças com o pâncreas humano, uma vez que ambos drenam secreção para o duodeno, mantém funções

endócrinas e exócrinas e são similares no conteúdo celular (incluindo células acinares, ductais, estreladas e endócrinas) ²⁷. Dependendo do modelo utilizado, é possível estudar a pancreatite dentro de suas classificações, como a pancreatite aguda leve (edematosa intestinal) e a pancreatite aguda grave (necrotizante).

Em 1977, Lampel e Kern ⁵³ relataram que a administração intravenosa de altas concentrações do hormônio intestinal colecistocinina, ou seu análogo, caeruleína (originalmente derivada da pele do sapo australiano *Hyla caerulea*), induz uma forma leve e reversível de pancreatite em ratos. Atualmente, este é o modelo mais utilizado, e pode ser reproduzido tanto em ratos quanto em camundongos⁵⁴.

O conceito de que a PA é essencialmente uma doença de autodigestão do pâncreas por suas próprias proteases foi proposto há mais de 100 anos ⁵⁵ e a confirmação desse processo no modelo de secretagogo tornou esse conceito ainda mais atraente. Embora a estimulação supramáxima do pâncreas com agentes exógenos não seja uma causa frequente de pancreatite humana, ainda é fisiologicamente relevante e foi descrita em pacientes que receberam altas concentrações de secretagogo acidentalmente ou após uma picada de escorpião, resultando em aumento dos níveis de acetilcolina nos terminais nervosos ⁵⁶. Atualmente, o protocolo mais amplamente utilizado para a indução de pancreatite aguda em camundongos envolve 7 injeções intraperitoneais de caeruleína sintética (50 µg / kg de peso corporal) em intervalos de 1h ⁵⁷.

Um modelo de PA proposto por Aho et al. ^{58,59} tem sido amplamente aceito como modelo representativo de pancreatite aguda grave, por mostrar necrose pancreática. Esse tipo de pancreatite aguda pode ser induzida em camundongos pela inserção de uma cânula no ducto pancreático (acessando-o através do orifício no duodeno) e infusão de 30 a 50µL de taurocolato de sódio de 2,5 a 5% de maneira retrógrada ⁶⁰. Como os ductos pancreáticos e biliares formam um longo canal comum, é necessário bloquear o ducto biliar ao nível do hilo hepático com uma pinça para evitar o refluxo do taurocolato para o fígado. Além disso, a cânula deve ser removida após a infusão do taurocolato para permitir e manter um fluxo normal do suco biliar e suco pancreático através do ducto. A desvantagem deste modelo é a incisão abdominal que deve ser realizada para realizar o experimento e a experiência necessária do pesquisador para inserir a cânula através do orifício do ducto pancreático. Entre 6 e 12 horas após a pancreatite podem ser observadas ascite e necrose hemorrágica do pâncreas ⁶¹.

Outros modelos de pancreatite aguda experimental incluem o modelo de pancreatite hemorrágica aguda induzido em roedores fêmeas jovens por dieta deficiente em colina e suplementada com etionina. A taxa de mortalidade deste protocolo se aproxima de 100%, que se constitui uma vantagem para avaliar eficácia de novos medicamentos ou intervenções, já a limitação está no uso de fêmeas jovens (entre 4 e 6 semanas) ⁶²; Outro modelo que tem sido utilizado para induzir pancreatite aguda grave em ratos se dá pela injeção de L-arginina, que é um aminoácido essencial. Mizunuma et al.(1984) mostraram que uma única injeção intraperitoneal de uma dose excessiva de L-arginina (500 mg / 100 g de peso corporal) induz pancreatite necrosante aguda em ratos, com alterações degenerativas nas células acinares, mas o mecanismo patogênico não está bem esclarecido ⁶³; Já o modelo de PA por ligadura do ducto pancreático se desenvolve de forma similar à pancreatite por cálculo biliar ou do refluxo biliar no ducto pancreático¹ No entanto, ainda que se saiba que as maiores causas de pancreatite aguda se deem por consumo de álcool ou cálculo biliar, experimentalmente esses modelos não são reprodutíveis⁵. Assim, tanto o modelo de PA induzida por secretagogo quanto por injeção de ácido biliar intraducto representam boas alternativas para mapear os mecanismos fisiopatológicos da PA leve e grave reespectivamente, possibilitando análises de variáveis que ocorrem na clínica de humanos, ainda que a causa inicial seja divergente.

1.3.1 Pancreatite aguda experimental por ceruleína

A ceruleína é um decapeptídeo isolado da pele do sapo australiano *Hyla caerulea*, uma substância análoga a colecistocinina (CCK), que atua como um estimulante da secreção pancreática fisiológica além de estimular a contração do músculo liso e secreção gástrica ⁶⁴. Experimentalmente ambas as substâncias são capazes de induzir pancreatite experimental em camundongos, podendo ser administrado por via intravenosa, subcutânea ou intraperitoneal. A ceruleína aumenta a secreção de enzimas proteolíticas pancreáticas em níveis capazes de causar autólise das células acinares ⁶⁵.

O mecanismo de ação da ceruleína se dá pela atuação em dois subtipos de receptores de CCK (CCK1 e CCK2). Esses receptores são acoplados a proteína G, que ativam a fosfolipase C e induzem o inositol trifosfato (IP3), dependente da liberação de Ca⁺⁺ a partir do retículo endoplasmático em células acinares no pâncreas ⁶⁶. O receptor CCK1 medeia a secreção de enzimas digestivas e está envolvido na regulação da saciedade, enquanto o

CCK2 estimula a produção de ácido gástrico. Desse modo, o receptor CCK1 tem um papel nos efeitos exócrinos da ceruleína, como a secreção de amilase ⁶⁷.

No modelo de pancreatite induzida por ceruleína podem ser observados danos ao tecido pancreático, caracterizado por infiltrado de células inflamatórias, vacuolização, depleção de grânulos de zimogênio, necrose de células acinares e edema. Mudanças nos parâmetros bioquímicos séricos também ocorrem, tal como aumento da amilase e lipase sérica, aumento do estresse oxidativo e da atividade de mieloperoxidase pancreática, aumento de citocinas pró inflamatórias (ex. TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), redução das citocinas anti-inflamatórias (ex. IL-10). Também foi observado aumento na expressão de COX-2 e iNOS ⁵⁴.

Em um artigo de revisão, Kim em 2008⁶⁸ apresenta um esquema gráfico que propõe o mecanismo de ação da ceruleína na indução da pancreatite aguda. Segundo conclusões do autor, após revisar uma literatura vasta, o estresse oxidativo proporcionado pela ceruleína é o principal responsável no desencadeamento da inflamação aguda do pâncreas. Entretanto, as limitações deste método consistem no fato da pancreatite aguda desenvolvida ser leve, com característica edematosa intersticial, ausência de necrose e com danos reversíveis, impossibilitando a realização de curvas de mortalidade⁶⁴.

1.3.2 Ácido taurocólico e pancreatite aguda

Os ácidos biliares (ABs) são produtos fisiológicos finais do metabolismo do colesterol, e suas funções são basicamente a emulsificação de agregados lipídicos e a solubilização de lipídeos em ambiente aquoso⁶². Os principais ABs em humanos são o ácido quenodeoxicólico (ACDC) e o ácido cólico (AC), conhecidos como ABs primários, pois são sintetizados no fígado, mas antes de serem secretados pelos hepatócitos, são conjugados com taurina ou glicina, o que aumenta sua polaridade e solubilidade em água. Ácidos biliares secundários, como ácido desoxicólico (ADC) e ácido litocólico (ALC), são produzidos no cólon por desidroxilação bacteriana dos AB primários. Sob condições fisiológicas, os ABs são armazenados temporariamente na vesícula biliar e liberados no intestino sem entrar no pâncreas, mas sob condições fisiopatológicas (ex: obstrução da ampola de Vater por um cálculo biliar), o suco biliar pode entrar nos ductos pancreáticos e desencadear pancreatite ⁶⁹.

Foi demonstrado que um dos ABs mais tóxicos para as células acinares é o AB secundário, ácido taurocólico, que se forma a partir do ALC após reabsorção pelo intestino

⁷⁰. A injeção retrógrada desse ácido no ducto pancreático de roedores é um modelo eficaz e reprodutível da condição grave da PA e tem sido amplamente utilizado pela comunidade científica por ser representativo da condição clínica humana, reproduzindo eventos inflamatórios correspondentes ao início da pancreatite biliar clínica, sendo que a gravidade do dano pancreático pode ser definida dependendo da concentração, velocidade e volume de ácido infundido, com rápida evolução e letalidade ⁶⁰. Embora os mecanismos que levam à pancreatite biliar aguda não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que os eventos intracelulares são semelhantes aos já mencionados no modelo de indução por secretagogo, que promove mobilização do Ca^{2+} intracelular dependente de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)⁵¹, levando à ativação enzimática e / ou morte celular, tendo como consequência necrose acentuada do tecido e eventos inflamatórios característicos de uma crise aguda⁷¹. O desfecho é um intenso processo inflamatório por extravasamento de enzimas digestivas e autodigestão do pâncreas, com alterações histopatológicas, elevação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) no líquido ascítico e no soro e proteínas de fase aguda^{36,72,73}.

A pancreatite aguda grave é uma condição que merece atenção clínica devido ao envolvimento de múltiplos órgãos e ao alto risco de mortalidade. Embora o método de infusão de taurocolato de sódio tenha muitas publicações na comunidade científica, os pesquisadores se limitaram a reproduzir esse modelo em ratos devido à maior facilidade de manuseio quando comparado a camundongos^{74,75}, visto que esses experimentos envolvem procedimentos cirúrgicos. As linhagens consanguíneas de camundongos são essenciais para pesquisas em laboratório e tais estudos trazem contribuições claras para muitos campos de pesquisa. Os Camundongos C57BL/6 são cepas consanguíneas originalmente desenvolvidas para estudos de atividade antitumoral e imunologia, e estão cada vez mais sendo utilizados⁷⁶. Para trabalhos que envolvam a necessidade de experimentos com anticorpos, análise de expressão gênica e protéica, o uso de camundongos é preferível devido ao maior arsenal de materiais no mercado para esses animais e pela possibilidade de trabalhar com espécies isogênicas, *knockout*, entre outras que proporcionem desfechos relevantes para as pesquisas⁷⁷. A partir desta tese foi publicado um roteiro para reprodução deste método em camundongos⁷⁸.

1.4 O peritônio

O peritônio é definido classicamente como uma membrana serosa que reveste a cavidade abdominal, contendo o fígado, o pâncreas, o baço, a maioria do trato

gastrointestinal e outras vísceras. Assim, sua classificação é baseada em uma abordagem anatômica, podendo ser renomeado de duas formas: peritônio visceral, que reveste as vísceras; e parietal, que reveste a parede da cavidade abdominal⁷⁹. No entanto, essa classificação é um tanto reducionista, uma vez que não leva em consideração aspectos fisiológicos importantes, como a composição dessa estrutura. Desde o ano de 1968 Bertalanffy⁸⁰, conhecido como o pai da teoria de sistemas, publicou sobre a importância de considerar as complexas interações de moléculas, células, tecidos e órgãos para classificá-los corretamente, e a busca por esse entendimento é a abordagem mais apropriada para a compreensão do peritônio. De Lamballe, em 1829, foi o primeiro a destacar as funções protetoras do peritônio na cavidade abdominal; já em 1880, Senn utilizou-se desse conhecimento para uma inovação cirúrgica: usou retalhos omentais para proteger suturas intestinais⁸¹. Sem falar no mesentério, que é composto de peritônio, mas nos é apresentado como uma estrutura independente⁸².

Uma recente revisão de literatura chama atenção para a relação complexa e dinâmica do conteúdo peritoneal na fisiopatologia de doenças, tal como o estudo de sua fisiologia, pois a maioria das pesquisas voltaram-se apenas para aspectos clínicos da diálise peritoneal, enquanto que a abordagem dos mecanismos moleculares e celulares que orquestram essas modificações ainda permanecem pouco esclarecidas⁸³. Ainda nesta revisão, os autores retomam a discussão para algumas importantes funções do peritônio já abordadas, dentre elas, a participação na embriogênese intestinal primitiva⁸², transporte celular⁷⁹ barreira fisiológica, indução imunológica, modulação e inibição, reparação e cicatrização de tecidos^{79,84}; proteção contra adesão e disseminação tumoral^{85,86}; e migração celular^{79,87}.

No interior da cavidade peritoneal circula uma pequena quantidade de líquido (entre 5 e 100 mL em humanos) que é descrito como derivado da ultra-filtração sanguínea contendo elementos imunes do sistema complemento, imunoglobulinas, peptídeos antimicrobianos, defensas, células imunes (macrófagos, células B e células T, NK, dendríticas e eosinófilos), mastócitos e células mesoteliais⁸⁸⁻⁹³, funcionando como uma barreira fisiológica contra infecção.

A presença de um número elevado de macrófagos (em torno de 60%) e linfócitos B (cerca de 50%) residentes na cavidade peritoneal (PerC) torna este um sítio preferido para a coleta dessas células⁹⁴. Os macrófagos são células dinâmicas que se diferenciam em macrófagos classicamente (M1), ou alternativamente (M2) ativados com propriedades

específicas e fenotípicas, sob a influência de sinais do microambiente local e que se diferenciam metabolicamente⁹⁵. No entanto, tratando-se de macrófagos peritoneais é preciso ter cuidado com esta classificação, uma vez que há um dinamismo e plasticidade muito grande dessas células de acordo com o estímulo em que são expostas⁹⁴. A literatura menciona uma população majoritária de macrófagos peritoneais que não cabe na classificação M1 e M2, pois estes macrófagos apresentam um fator de transcrição exclusivo (GATA 6) e podem se comportar tanto como o macrófago clássico (M1), realizando fagocitose e liberando citocinas inflamatórias, quanto M2, atuando de forma mais reparadora e produzindo IL-10, protegendo contra inflamação⁹⁶⁻⁹⁸. Esses macrófagos peritoneais residentes têm sido referenciados como grande macrófago peritoneal (*large peritoneal macrophage*) (LPM), por serem relativamente maiores que os macrófagos diferenciados a partir de monócitos de origem medular presentes na circulação. Esses macrófagos pequenos que também podem ser encontrados na cavidade peritoneal, são denominados *small peritoneal macrophage* (SPM), mas fisiologicamente estão em pequena quantidade⁹⁹. Tanto o LPM quanto o SPM podem ser identificados pela técnica de imunofenotipagem e citometria de fluxo a partir de seus marcadores fenotípicos expressos na membrana celular. Os LPMs expressam altos níveis de F4/80 e CD11b, e baixos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHCII), parecem ser originários de precursores embriogênicos, e sua manutenção em PerC é regulada pela expressão de fatores específicos de transcrição e sinais derivados de tecidos. Por outro lado, os SPMs, têm um fenótipo F4/80^{low}CD11b^{low} e MHCII^{high} e são gerados a partir de precursores mielóides derivados da medula óssea^{94,100}. Em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios, a composição celular de PerC é dramaticamente alterada, onde LPMs “desaparecem” e SPMs se tornam a população prevalente junto com seu precursor, o monócito inflamatório⁹⁷. Foi demonstrado que camundongos Mac-Gata6 KO desenvolveram LPMs na cavidade peritoneal com expressão reduzida de F4/80. Além disso, o número de LPMs, mas não SPMs, colhidos do exsudato peritoneal foi bastante reduzido em camundongos Mac-Gata6 KO, ou seja, os SPM repovoam a PerC na ausência de LPM, ainda que não haja estímulo inflamatório ou infeccioso, mas esse mecanismo ainda não foi esclarecido¹⁰¹.

Os SPMs parecem ser a principal fonte de mediadores inflamatórios no PerC durante a infecção, enquanto os LPMs contribuem para a produção de IgA independente do tecido linfóide associado ao intestino e dependente do ácido retinóico pelas células B1 peritoneais¹⁰². A cavidade também é importante para o estudo das células T, Natural Killer,

dendríticas e granulócitos (principalmente eosinófilos), além das células B1 (que constituem uma população celular majoritária) e células B2 convencionais¹⁰⁰, que podem ser diferenciadas quanto à expressão de CD11b⁺, uma integrina que juntamente com CD18 forma o heterodímero CR3. As células B1 são subdivididas em B1a e B1b, que podem ser distinguidas pela expressão superficial do CD5. As células B1 (CD11b⁺) são uma importante fonte de IgM natural, fornecendo proteção precoce a uma variedade de agentes patogênicos. As células B1a (CD11b⁺CD5⁺) possuem propriedades moduladoras em virtude da sua elevada capacidade de produção de IL-10¹⁰³.

1.5 “Step up approach”- Técnicas minimamente invasivas e lavagem peritoneal no contexto da PA grave.

Na pior das hipóteses a PA evolui para pancreatite necrotizante infectada com falência de órgãos, podendo atingir uma taxa de mortalidade de 35%¹⁵. O manejo da pancreatite necrotizante infectada mudou drasticamente nos últimos 20 anos e continua a evoluir com o crescente conhecimento, novas técnicas e esforços contínuos de pesquisa. A escolha da estratégia de tratamento mais apropriada é uma decisão complexa que deve ser multidisciplinar, pois utiliza técnicas que abrangem as áreas de gastroenterologia, cirurgia, radiologia e cuidados intensivos¹⁰⁴.

Pacientes com pancreatite aguda necrotizante e/ou infectada podem ser tratados de várias maneiras, mas a decisão sobre como tratar é amplamente baseada na localização das coleções infectadas, extensão da doença, disponibilidade de equipamentos e conhecimento das várias técnicas. Ainda que seja uma doença heterogênea e que as estratégias de tratamento sejam diferentes para cada paciente, apresenta objetivos comuns ao tratamento: reduzir a SIRS, o estresse oxidativo e impedir a insuficiência de órgãos. Normalmente, a primeira estratégia utilizada para tal é a administração de antibióticos¹⁰⁵, que complementa intervenções mais invasivas ou até evita a necessidade das mesmas. Em segundo plano, o foco é minimizar as complicações da doença, bem como intervir para tratá-las²⁵.

Alguns estudos trazem dados interessantes sobre o uso dos intervenções minimamente invasivas no contexto da pancreatite necrotizante. Em 2010, os resultados do estudo randomizado PANTER, conduzido pelo *Dutch Acute Pancreatitis Study Group* demonstrou vários benefícios da *step-up approach* sobre a necrosectomia aberta, como redução da falência de órgãos, perfuração, fístula ou sangramentos. Em 2012, um pequeno

estudo randomizado (o estudo PENGUIN) mostrou redução do risco de complicações graves no grupo que realizou drenagem transgástrica endoscópica versus a necrosectomia cirúrgica (20% vs. 80%, respectivamente)¹⁰⁶.

O Grupo de Estudo da Pancreatite da Alemanha realizou um estudo multicêntrico entre janeiro de 2008 e junho de 2014 com 220 pacientes e constatou que apenas 44% dos pacientes na intervenção intensiva (drenagem percutânea, drenagem endoscópica, com ou sem necrosectomia minimamente invasiva) apresentaram complicações graves em comparação com 73,3% dos pacientes no grupo necrosectomia aberta. Além disso, a mortalidade foi menor, com 10,5% no grupo intensivo versus 33,3% no grupo aberto¹⁰⁷.

A primeira tentativa de usar o peritônio humano para dialisar os solutos de retenção urêmica foi feita há quase 100 anos¹⁰⁸. A diálise peritoneal (DP) é uma forma bem-sucedida de terapêutica de substituição renal, síndrome cardiorenal¹⁰⁹ e também uma abordagem para tratar pancreatite aguda necrotizante. O procedimento se dá pela introdução de líquido de diálise na cavidade peritoneal, que permanece algumas horas em circulação e depois é drenado. O objetivo é a remoção de toxinas dialisáveis, evitando distúrbios metabólicos graves, e isso é possível devido o líquido inserido apresentar eletrólitos em sua composição, exercendo uma pressão osmótica no local e possibilitando a filtração de metabólitos indesejáveis presentes no sangue¹¹⁰⁻¹¹². Outro fator que possibilita o sucesso da DP é a presença da molécula aquaporina-1, que é expressa constitutivamente nas células endoteliais que revestem os capilares peritoneais. A aquaporina-1 é membro de uma família de canais de água altamente conservada, organizada como homotetrâmeros, com cada monômero contendo um poro central que facilita o movimento de água através das membranas lipídicas¹⁰⁸, assim permitindo a ultrafiltração de líquidos e remoção de toxinas. Mas além disso, é importante a destreza na inserção do cateter e cuidados quanto ao volume e pressão de líquido injetado¹¹³.

A lavagem peritoneal contínua (LPC) é estruturalmente similar à diálise peritoneal, mas o líquido de lavagem introduzido na cavidade peritoneal é concomitantemente drenado por um cateter de saída. A LPC foi introduzida no tratamento da PA com base na teoria de que a eliminação da ascite contendo citocinas inflamatórias e mediadores inflamatórios reduz a gravidade da doença. Esses dados sugerem que uma abordagem intensiva a partir da lavagem peritoneal pode ser benéfica¹¹⁴.

Nos anos 80, vários ensaios clínicos randomizados não revelaram os efeitos benéficos da lavagem peritoneal, bem como questionaram essa intervenção como principal

tratamento da pancreatite aguda ¹¹⁵⁻¹¹⁸. Apesar disso, permanecem relatos de benefícios da lavagem peritoneal em modelos experimentais de pancreatite aguda e também no cenário clínico¹¹⁹.

Um estudo prospectivo comparou os efeitos da drenagem percutânea com a lavagem peritoneal contínua em pacientes com pancreatite aguda grave, mostrando que os dois procedimentos não foram diferentes quanto à redução da mortalidade ou complicações maiores decorrentes da condição. No entanto, a lavagem contínua teve vantagens adicionais por ter reduzido a incidência de trombose venosa profunda e encefalopatia pancreática nesses pacientes¹²⁰.

Um estudo conduzido por pesquisadores coreanos avaliou os efeitos da lavagem peritoneal em uma amostra de 58 pacientes que apresentavam PA de moderada a grave. Desses pacientes, 31 receberam apenas tratamento convencional (nutrição enteral, descompressão gastrointestinal, antibióticos, ressuscitação hídrica, antiácidos e analgésicos) e 27 receberam tratamento convencional e lavagem peritoneal. Após avaliar leucócitos no sangue, proteína C reativa no soro, função hepática, renal, pancreática e mortalidade, os autores concluíram que a lavagem peritoneal contínua pode reduzir significativamente a mortalidade, tal como as complicações e o tempo de internação hospitalar em PA moderada a grave¹¹⁴.

Ainda que se conheça o efeito protetor da lavagem nos casos mais graves de pancreatite aguda, os mecanismos que envolvem a participação de células peritoneais na fisiopatologia da doença ainda não foram esclarecidos, assim como também não é conhecida a eficácia da lavagem peritoneal em fases mais precoces da PA e em modelos de pancreatite leve. Vale ressaltar que também já foi descrito na literatura o envolvimento de células peritoneais residentes na maior sobrevivência em modelos animais de sepse¹²¹, tumor peritoneal¹²² e hepatite ¹²³, demonstrando a importância imunológica das mesmas no mecanismo fisiopatológicos de doenças e a possibilidade de serem alvos farmacológicos no futuro. Os estudos clínicos que mostraram os efeitos benéficos da lavagem peritoneal só reforçam a necessidade de investigar quais são as células peritoneais envolvidas na fisiopatologia da doença, tal como as citocinas presentes naquele ambiente inflamatório. A partir disso, este estudo se propôs caracterizar o perfil de células peritoneais e aspectos funcionais durante e após a lavagem peritoneal em modelo de pancreatite aguda leve e grave em camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da lavagem peritoneal contínua na pancreatite aguda leve e grave em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Caracterizar o fenótipo de células coletadas do peritônio durante a lavagem peritoneal (após indução da pancreatite aguda leve e grave).

2.2.2. Caracterizar o fenótipo de células presentes no lavado peritoneal após 12 horas de indução da pancreatite aguda leve e grave.

2.2.3. Investigar os efeitos da lavagem peritoneal no conteúdo de citocinas inflamatórias do lavado peritoneal e soro após 12 horas de indução da pancreatite aguda leve e grave.

2.2.4. Observar o impacto da lavagem peritoneal na sobrevivência de animais com pancreatite aguda grave durante 16 horas.

2.2.5. Identificar a influência da lavagem peritoneal sobre o conteúdo de amilase sérica após 12 horas de pancreatite aguda leve e grave.

3 MÉTODOS

3.1 Animais e descrição dos grupos experimentais

Fizeram parte do estudo 100 camundongos machos (C57black/6) de 7 semanas, pesando 25 ± 5 g, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno contendo cinco animais cada, à temperatura de 23 ± 2 °C, umidade de $54 \pm 9\%$, ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* à água e ração. Após ambientação, os camundongos foram divididos em grupos ($n=7-10$ /grupo), conforme o protocolo proposto. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina da USP, Num.Proj:974/2018 e 1343/2019-CEUA: FMUSP.

3.2 Indução da pancreatite aguda leve por ceruleína e grupos experimentais

Para indução da pancreatite aguda por ceruleína, utilizou-se a *Caerulein* Sigma-Aldrich® (C9026-1000 μ g) ressuspendida em solução salina 0,9% para uma concentração de 1000 μ g/ mL e depois diluída para uma solução de uso de 20 μ g/ mL, aplicada em uma dose de 100 μ g/ Kg¹²⁴. O grupo controle (CTL) - recebeu 0,1 mL de solução salina 0,9% via subcutânea (SC); já os grupos pancreatite aguda - ceruleína (PA^{CER}) e pancreatite aguda ceruleína+lavagem (PA^{CER}+LV) receberam seis injeções SC da solução de ceruleína em intervalos de 1h cada e uma última injeção na mesma concentração, intravenosa (veia da cauda). Antes que se completassem as sete injeções, parte dos animais PA^{CER} escolhidos aleatoriamente foram anestesiados com solução de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e submetidos à lavagem peritoneal com infusão contínua de tampão salina fosfato 1X (PBS1X) conforme descrito no tópico 3.4; estes foram denominados PA^{CER}+LV. A **Figura 1** mostra a divisão dos grupos experimentais.

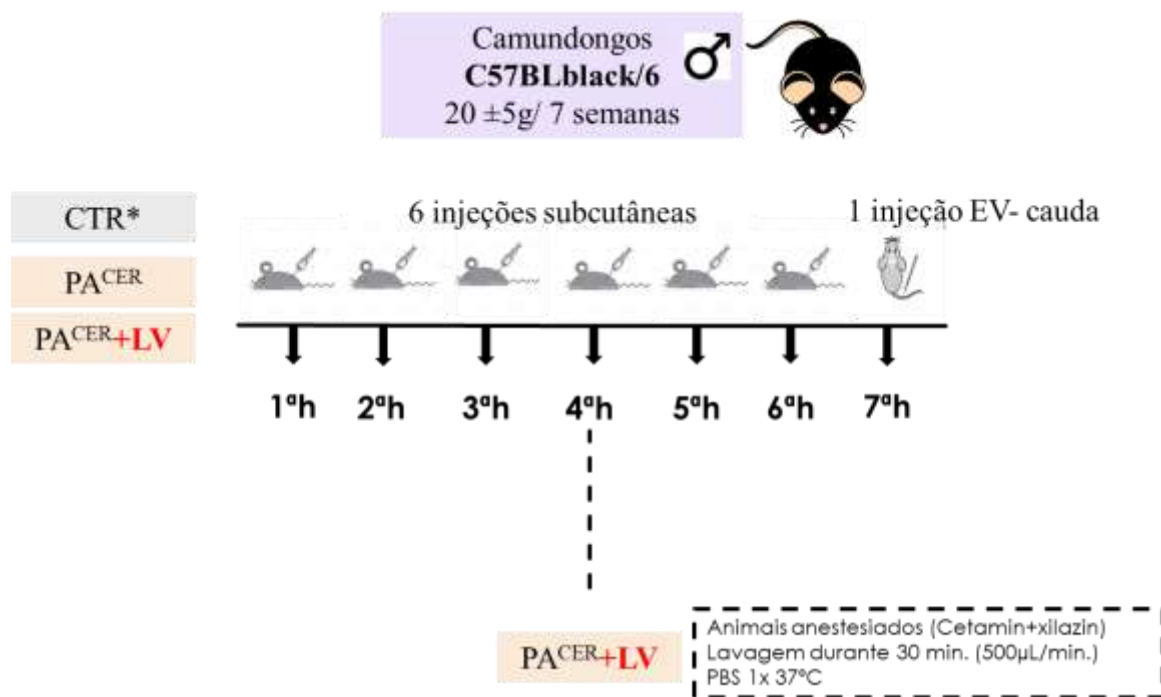
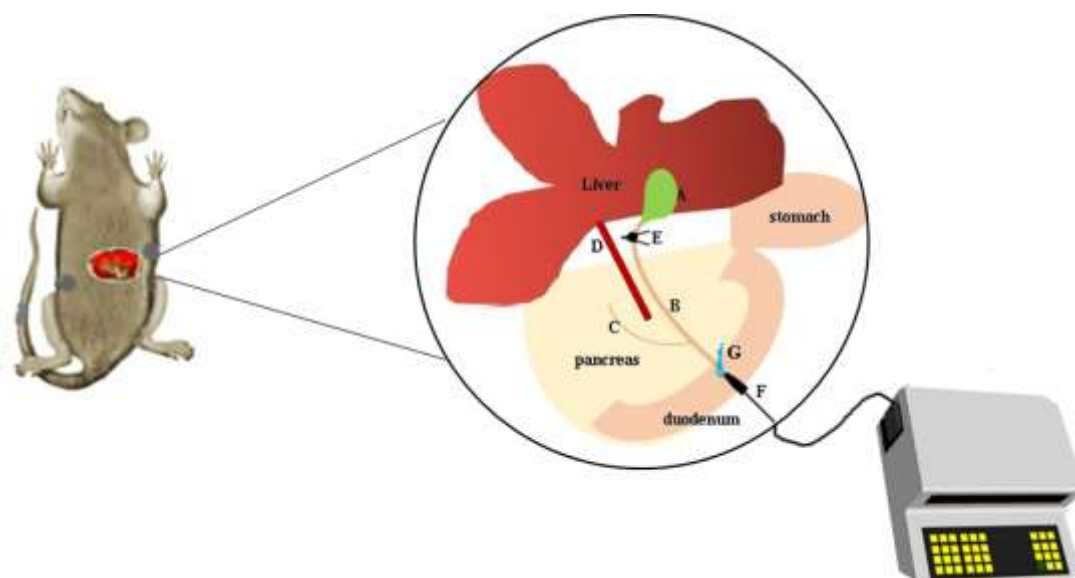


Figura 1. Grupos experimentais e esquema de indução da pancreatite aguda por ceruleína. Controle (CTL) - recebeu 0,1 mL de solução salina 0,9% via subcutânea (SC); pancreatite aguda- ceruleína (PA^{CER}) e pancreatite aguda ceruleína+lavagem (PA^{CER}+LV) receberam seis injeções (SC) da solução de ceruleína em intervalos de 1h cada e uma última injeção na mesma concentração, intravenosa (veia da cauda). Antes que se completassem as sete injeções, parte dos animais PA^{CER} escolhidos aleatoriamente passaram por uma lavagem peritoneal e foram denominados PA^{CER}+LV.

3.3 Indução da pancreatite aguda por taurocolato de sódio 2,5% e grupos experimentais

Para indução da pancreatite aguda por taurocolato de sódio, os animais foram previamente anestesiados com solução de xilazina (10 mg/Kg) /cetamina (80 mg/Kg) e em seguida foi realizada uma laparotomia mediana de 10 mm. O duodeno foi puncionado com agulha de 0,4 mm conectada a tubo de polietileno de 0,54 mm para inserção da agulha no ducto pancreobiliar; o vazamento de taurocolato de sódio para o duodeno foi prevenido por ligadura temporária do ducto biliar distal, utilizando fio de sutura prolene 8-0, ao passo em que o ducto biliar proximal estava temporariamente ocluído com um clipe de microvasos (**Figura 2**)¹²⁵. O taurocolato de sódio foi infundido a uma taxa constante com bomba de infusão (Havard apparatus- *Peristaltic Pump Series, Model 66 Small Peristaltic*). A duração da infusão foi de 3 minutos (10µL/ min) e a pressão no sistema de infusão foi monitorada constantemente. Depois da infusão, o clipe de microvasos, a agulha de injeção, bem como a ligadura distal foram removidas do ducto pancreobiliar para reconstituir o fluxo fisiológico da secreção biliar. Ao final, o abdômen foi suturado com prolene 6-0⁶⁰.



FONTE: Serra, et al.⁷⁸

Figura 2. Esquema da indução de pancreatite aguda grave por taurocolato de sódio a 2,5% em camundongos C57BL/6. (A) vesícula biliar; (B) ducto pancreobiliar; (C) ducto pancreático; (D) veia porta; (E) clipe de microvaso; (F) local de punção (agulha fixada em tubo de polietileno e conectada a bomba de infusão); (G) fixação temporária da agulha no ducto pancreobiliar.

Os animais foram divididos em 3 diferentes grupos de acordo com a intervenção proposta. Grupo SHAM: Grupo controle cirúrgico. Grupo pancreatite aguda (PA^{AT}): Passou pela laparotomia com posterior injeção de ácido taurocólico 2,5% intraducto pancreático. Pancreatite aguda+lavagem (PA^{AT}+LV): Mesmo procedimento anterior, seguido da lavagem peritoneal uma hora após a cirurgia.

3.4 Lavagem Peritoneal Contínua

Imediatamente após a quarta injeção de ceruleína e uma hora após a indução da PA no modelo de taurocolato de sódio, os animais dos grupos que passaram pela intervenção da lavagem, ainda sob efeito de anestesia ou com dose de manutenção, foram dispostos em posição dorso-lateral e um cateter 22G acoplado a uma bomba de infusão constante (Harvard apparatus- *Peristaltic Pump Series, Model 66 Small Peristaltic*) foi inserido na lateral abdominal esquerda superior para injeção de 500µL/ min., de PBS1X (NaCl+Na₂HPO₄ anidro+ KH₂PO₄+KCl, pH 7.2-7.4) durante 30 min, 37°C. Após os primeiros 4 min. de injeção, um cateter de saída (20G) foi inserido na lateral inferior abdominal direita e o líquido que saía por ação gravitacional era coletado para o interior de um tubo de 15 mL, imerso em gelo

para posterior caracterização celular por imunofenotipagem e citometria de fluxo ^{126,127} (Figura 3).

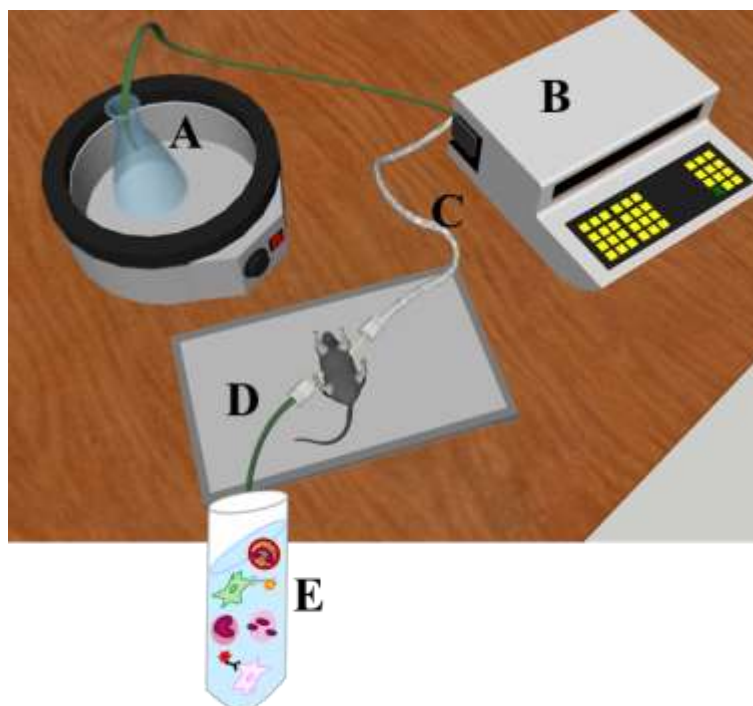


Figura 3. Lavagem peritoneal contínua. (A) PBS1X em banho maria 37°C; (B) bomba de infusão constante 500µL/ min por 30 min; (C) cateter 22G (entrada de PBS); (D) cateter 20G (saída); (E) suspensão de células coletadas (ilustração).

3.5 Eutanásia e coleta de material biológico

Após 12h de indução da PA nos dois modelos, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/Kg) /cetamina (80 mg/Kg), para coleta de aproximadamente 250µL de sangue via plexo orbital. Em seguida foram eutanasiados em câmara de CO₂ para coleta de células peritoneais e pancreas. Para coleta das células foram introduzidos 4 mL de PBS1X gelado, e com o auxílio de uma pipeta de bulbo a suspensão de células foi retirada. Parte do lavado peritoneal foi destinado para contagem global de células, seguido de imunofenotipagem e citometria de fluxo e outra parte foi centrifugada para coleta do sobrenadante, utilizado para dosagem de proteínas de interesse. O sangue foi centrifugado (2.500 rpm, 15 min) para a retirada do soro, e as alíquotas foram armazenadas em freezer - 80°C para as determinações bioquímicas.

3.6 Imunofenotipagem e citometria de fluxo

As amostras de lavado peritoneal obtidas após 1 hora de PA grave, 4 horas de PA leve e 12 horas de PA nos dois modelos, foram submetidas a análise por imunofenotipagem

e citometria de fluxo. A princípio foi realizada contagem global de células presentes nas suspensões coletadas, utilizando o citômetro de fluxo Guava[®] (Millipore Guava easyCyte 8HT). Em seguida, as amostras foram alíquotadas em tubos de 1,5 mL em uma concentração de $5 \cdot 10^5$ células, centrifugadas (1500 rpm/ 5min.), lavadas com solução de PBS1x+2%SFB, centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi marcado com anticorpos específicos de superfície celular durante 30 min. em geladeira, seguido de duas lavagens e fixação com 200µL de PBS1X+2%SFB+0,2%PFA. Os anticorpos monoclonais utilizados e suas respectivas fluorescências foram: Ly6G- PE, CD11b- APC (MERCK[®]); CD19 PE-Cy7, F4/80- AF488, Ly6G- PE, F4/80-PE-Cy7, CD11b-AF488, CD5-APC, CD49b, CD3 FITC (Biolegend[®])¹²⁸.

3.7 Quantificação de interleucinas por Milliplex

Para quantificação de interleucinas por Milliplex, foi utilizado o kit Millipore Mouse Cytokine/ Chemokine Magnétic Bead Panel (MCYTOMAG-70K). As concentrações de IL-1 β , IL-4, TNF- α , IL-6, MCP-1, MIP1- α , MIP-2 e IL-10 foram mensuradas no líquido peritoneal e no soro após 12 horas de PA leve e grave.

Foram adicionados 200 µL de Assay Buffer em cada poço da placa, a qual foi selada e mantida em um agitador de placas durante 10 minutos, em temperatura ambiente (20 a 25 ° C). Decorridos 10 minutos, decantou-se a placa e removeu-se o volume residual, invertendo-a em toalhas absorventes. Foram adicionados 25 µL de cada padrão ou controle nos poços adequados. Adicionou-se também 25 µL de Assay Buffer nos poços da amostra. Acrescentou-se 25 µL de solução matriz (especial para dosagem sérica) nos poços dos controles, background e padrão. Adicionou-se 25 µL de amostra (líquido peritoneal ou soro) nos poços correspondentes. Em seguida vortexamos o Mixing Bottle e adicionamos 25 µL das Premixed Beads em cada poço. Selou-se a placa, envolvendo-a com papel alumínio, para incubá-la em agitação por duas horas em temperatura ambiente (20-25°C).

Após este tempo, o conteúdo foi removido cuidadosamente, e a placa foi lavada duas vezes. Adicionou-se 25 µL de anticorpo de detecção e em seguida a placa foi selada, coberta com papel de alumínio e incubada em agitação durante 30 min. em temperatura ambiente (20-25°C). Passado este tempo, removeu-se cuidadosamente o conteúdo e a placa foi lavada duas vezes. Adicionou-se 125 µL de Sheath Fluid (driving fluid MAGPIX) em todos os poços e, posteriormente, a placa foi lida no MAGPIX (utilizando o sistema Luminex X-200 - Luminex Corp, Estados Unidos) por meio do software Xponent.

3.8 Dosagem de amilase no soro

A atividade de amilase foi mensurada no soro dos camundongos após 12 horas de PA leve e grave, utilizando o kit de ensaio da Labtest Diagnóstica SA, Brasil (Ref.: 11) a partir do método de *Caraway modificado*. Inicialmente procedeu-se à diluição das amostras na proporção de 1:10, utilizando Na Cl 0,85% como diluente. Em seguida, pipetou-se 100 μ L do substrato em *eppendorfs* correspondentes ao controle e aos testes, que foram incubados a 37 °C no banho maria por 2 minutos. Foi adicionado 10 μ L de cada amostra nos *eppendorfs* teste, que (juntamente com o controle) foram homogeneizadas por inversão e incubados a 37 °C no banho maria por exatos 7 minutos e 30 segundos cronometrados. Adicionou-se 100 μ L do reagente de cor de uso e 800 μ L de água deionizada tanto no controle quanto nos testes, seguido de homogeneização. Após 5 min. de descanso das amostras determinou-se as absorvâncias dos testes e controles em 660 nm, acertando o branco com água destilada. O cálculo da concentração sérica de amilase foi realizado em U/dL a partir da fórmula: [amilase U/dL]= (Absorvância do controle – Absorvância do teste) / Absorvância do controle x 800, multiplicados pelo fator de diluição que neste caso foi 10.

3.9 Curva de sobrevivência

Após a indução da pancreatite aguda grave por ácido taurocólico, os animais dos grupos PA^{AT} (n=7) e PA^{AT}+LV (n= 9) foram monitorados por 16 horas, sendo que na 4^a, 8^a, 14^a e 16^a hora pós indução era verificado se os animais permaneciam vivos.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparar as curvas de sobrevivência foi realizado o Log-rank (Mantel-Cox) Test. Nas demais situações, as diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste *Newman-Keuls*, usando GraphPad Prism, Inc software, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Lavagem peritoneal após 4 horas de pancreatite aguda leve

Após a quarta injeção de ceruleína (100µg/Kg) subcutânea, o grupo PA^{CER} + LV apresentou concentração média de $76 \pm 20,46 \times 10^3/\text{mL}$ de leucócitos totais presentes no líquido obtido da lavagem peritoneal contínua, comparado a um animal controle que passou pelo mesmo procedimento ($246 \times 10^3/\text{mL}$). Mas embora esses grupos tenham apresentado diferença na quantidade de células totais presentes na PerC, não houve diferença quanto ao tipo celular, conforme mostrado na **Figura 4**. As populações celulares encontradas tratam-se de células residentes do local.

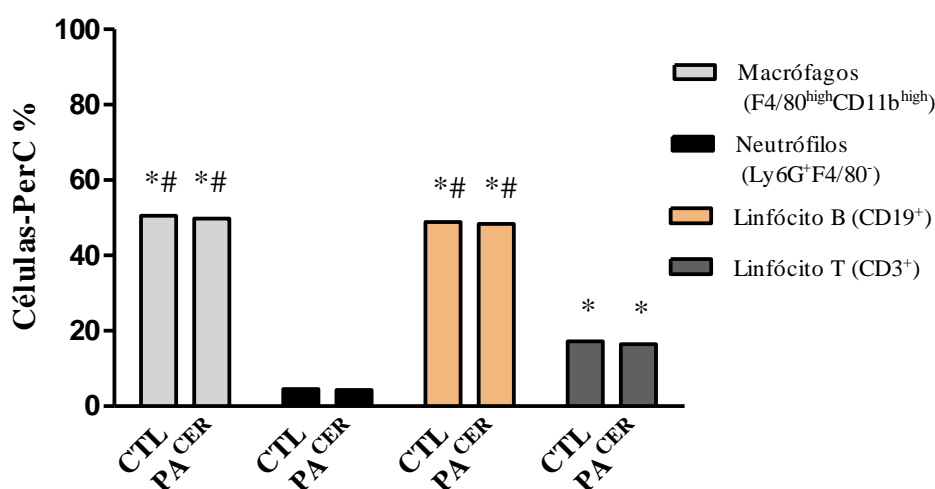


Figura 4. Percentual de macrófagos, neutrófilos e linfócitos B e T presentes na cavidade peritoneal (PerC) dos grupos CTL e AP^{CER} após a quarta injeção de ceruleína (100µg/Kg) subcutânea. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos celulares foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ macrófagos, linfócitos B e linfócitos T \neq neutrófilos; # $p < 0,05$ macrófagos e linfócitos B \neq linfócitos T.

4.2 Células presentes no lavado da PerC após 12 horas da PA leve em camundongos.

Após 12 horas da última injeção de ceruleína (100µg/Kg) endovenosa, a PerC de todos os animais foi lavada para contagem de leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mL}$). O número de leucócitos totais presentes na PerC aumentou no grupo PA^{CER}+LV ($12,94 \pm 2,16$) em relação aos grupos CTL ($5,70 \pm 0,59$) e PA^{CER} ($5,04 \pm 0,45$), que não apresentaram diferença entre si. Isso demonstra que após a retirada de células residentes da PerC durante a lavagem, existe

um repovoamento de células no local (**Figura 5**). Assim, identificamos essas células com base em seu fenótipo de superfície por meio da técnica de imunofenotipagem e citometria de fluxo, e observamos que o aumento de células presentes na PerC do grupo PA^{CER}+LV se deu às custas de macrófagos (PA^{CER}+LV: $64,81 \pm 2,37$; PA^{CER}: $41,68 \pm 2,42$; CTL: $35,35 \pm 1,33$). No entanto, conforme visualizado na **Figura 6** (a), (b), (c), (d) e (e), tratam-se de macrófagos com expressão intermediária de fenótipos F4/80 e CD11b, perfil característico do SPM (PA^{CER}+LV: $89,56 \pm 2,43$; PA^{CER}: $6,21 \pm 1,60$; CTL: $0,78 \pm 0,04$). Em contrapartida, o percentual de LPM foi menor no grupo PA^{CER}+LV ($5,48 \pm 1,32$), comparado ao PA^{CER} ($43,98 \pm 2,81$) e CTL: $35,35 \pm 1,53$).

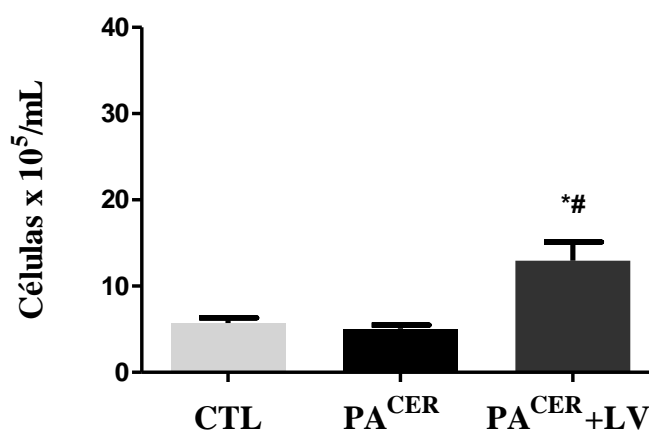


Figura 5. Células totais x 10⁵/mL presentes na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100µg/Kg). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 se PA^{CER}+LV ≠ CTL; #p<0,05 PA^{CER}+LV ≠ PA^{CER}.

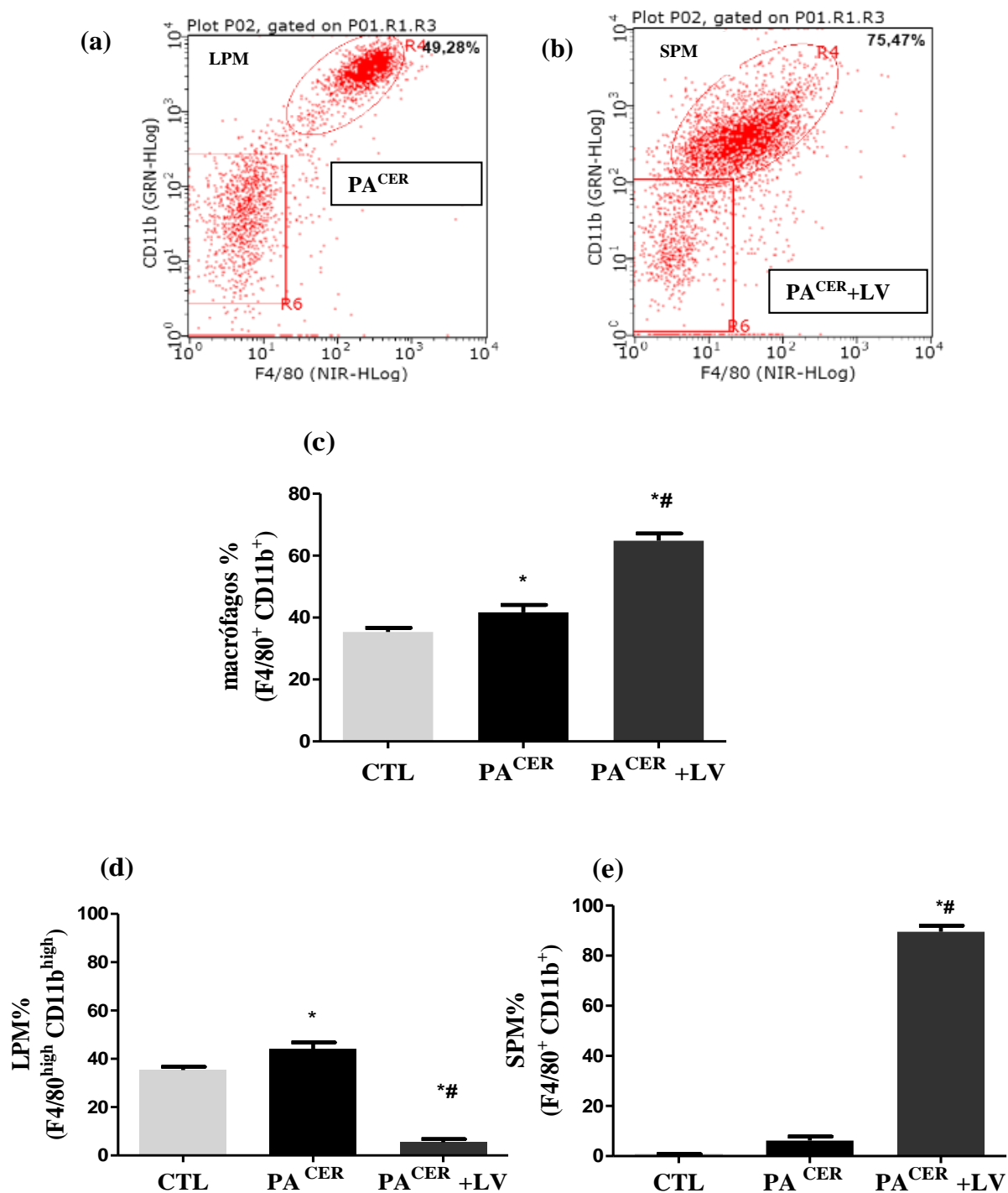


Figura 6. Percentual diferencial de macrófagos na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100µg/Kg). (a) dot plot representativo de macrófagos LPM no Grupo PA^{CER}; (b) dot plot representativo de macrófagos SPM no Grupo PA^{CER}+LV; (c) macrófagos (d) LPM (F4/80^{high} CD11b^{high}); (e) SPM (F4/80⁺ CD11b⁺). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou PA^{CER}+LV \neq CTL; # $p < 0,05$ PA^{CER}+LV \neq PA^{CER}.

Em relação ao percentual total de linfócitos B presentes na cavidade peritoneal 12 h após a LPC, [Fig. 7 (a)], foi notada redução dos linfócitos B totais ($CD19^+$) tanto no grupo PA^{CER} ($38,60 \pm 2,07$) quanto no $PA^{CER}+LV$ ($16,40 \pm 2,08$) em relação ao CTL ($54,26 \pm 1,45$), embora essa redução tenha sido mais expressiva no grupo $PA^{CER}+LV$. Partindo do percentual total de linfócitos B, ainda na mesma figura, é demonstrado um balanço entre os subtipos celulares (b) B1 ($CD19^+ CD11b^+$) e (c) B2 ($CD19^+ CD11b^{neg}$). Verificou-se que a redução de linfócitos B no grupo $PA^{CER}+LV$ em relação aos demais se dá às custas das células B1 ($PA^{CER}+LV: 29,90 \pm 2,71; PA^{CER}: 59,1 \pm 2,96; CTL: 61,46 \pm 1,72$), uma vez que as células B2 estão relativamente aumentadas neste grupo ($PA^{CER}+LV: 70,10 \pm 2,71; PA^{CER}: 40,09 \pm 2,96; CTL: 38,54 \pm 1,72$). Ao partir do percentual total de células (b) B1, verificou-se que o subtipo (d) B1a ($CD19^+ CD11b^+ CD5^+$) aumentou em percentual no grupo PA^{CER} ($28,33 \pm 1,69$) em relação ao CTL ($10,97 \pm 0,86$) enquanto que após a LPC houve redução desse subtipo no grupo $PA^{CER}+LV$ ($14,29 \pm 0,68$). Já o subtipo (e) B1b ($CD19^+ CD11b^+ CD5^{neg}$) reduziu em percentual no grupo PA^{CER} ($71,67 \pm 1,69$) em relação ao CTL ($89,03 \pm 0,86$), enquanto que após a LPC houve aumento desse subtipo no grupo $PA^{CER}+LV$ ($85,71 \pm 0,68$).

Linfócitos T ($CD3^+ CD4^+$), células NK ($CD49b^+$) e neutrófilos ($Ly6G^+ F8/80^{neg}$) também foram encontrados na cavidade peritoneal 12h após a LPC [Fig. 8 (a), (b), (c)], onde foi demonstrado que a pancreatite aguda leve induzida por ceruleína aumentou o percentual de linfócitos T helper ($PA^{CER}+LV: 25,32 \pm 2,19; PA^{CER}: 44,53 \pm 4,91; CTL: 27,28 \pm 2,56$) e células NK ($PA^{CER}+LV: 3,24 \pm 0,4; PA^{CER}: 5,17 \pm 0,34; CTL: 3,38 \pm 0,50$) em relação controle, mas após a intervenção da lavagem peritoneal contínua o grupo $PA^{CER}+LV$ apresentaram redução desses grupos celulares. Em relação aos neutrófilos o grupo PA^{CER} ($2,98 \pm 0,31$) não apresentou diferença estatística quanto ao percentual dessas células para o grupo CTL ($2,13 \pm 0,41$), embora tenha-se notado aumento no grupo $PA^{CER}+LV$ ($5,61 \pm 0,54$).

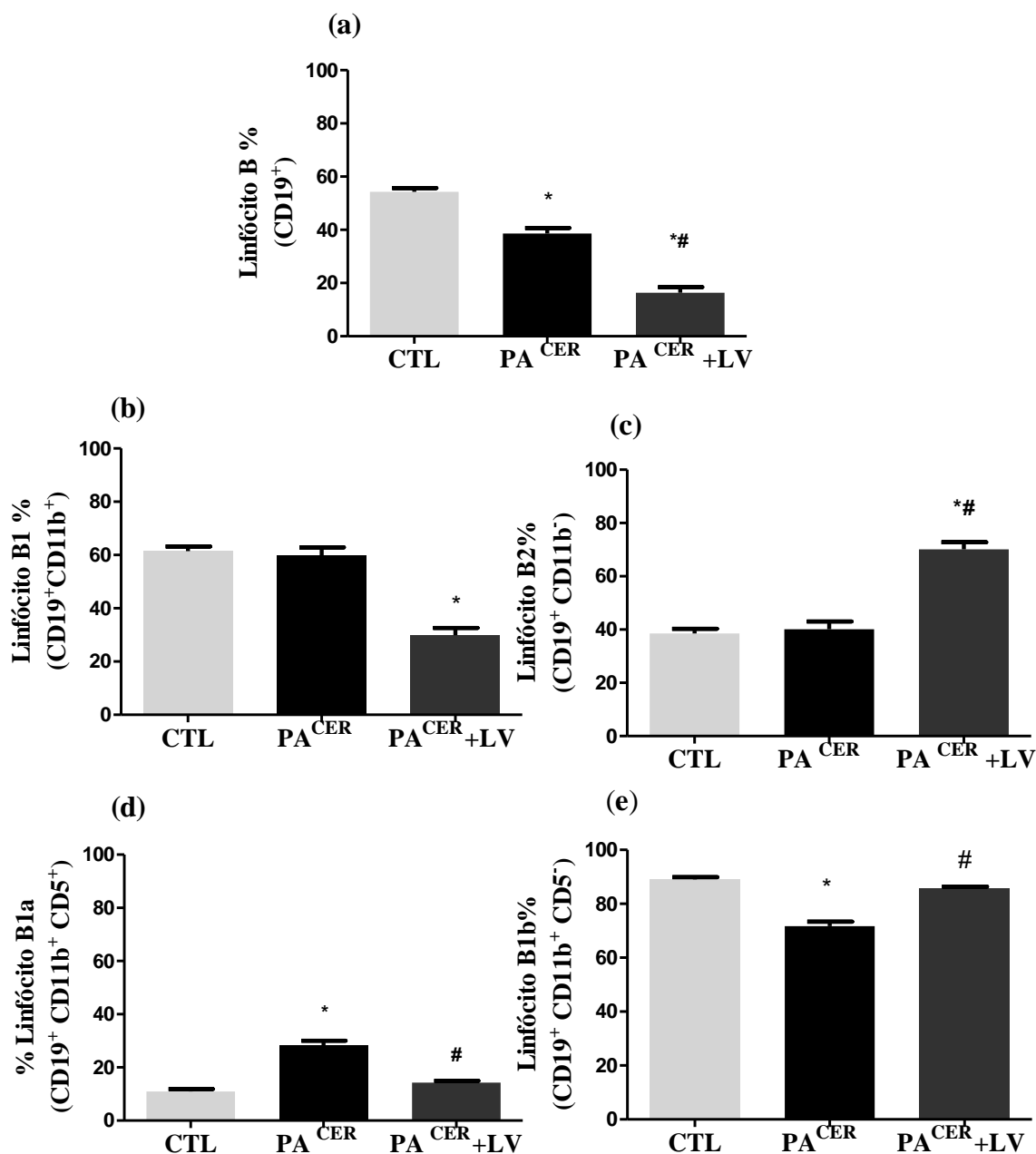


Figura 7. Percentual diferencial dos linfócitos B presentes na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100µg/Kg). (a) linfócitos B (CD19⁺); (b) linfócitos B1(CD19⁺CD11b⁺) ; (c) linfócitos B2 (CD19⁺CD11b^{neg}); (d) linfócitos B1a (CD19⁺CD11b⁺CD5⁺); (e) linfócitos B1b (CD19⁺CD11b⁺CD5^{neg}) . As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 se PA^{CER} e/ou PA^{CER}+LV ≠ CTL; #p<0,05 PA^{CER}+LV ≠ PA^{CER}.

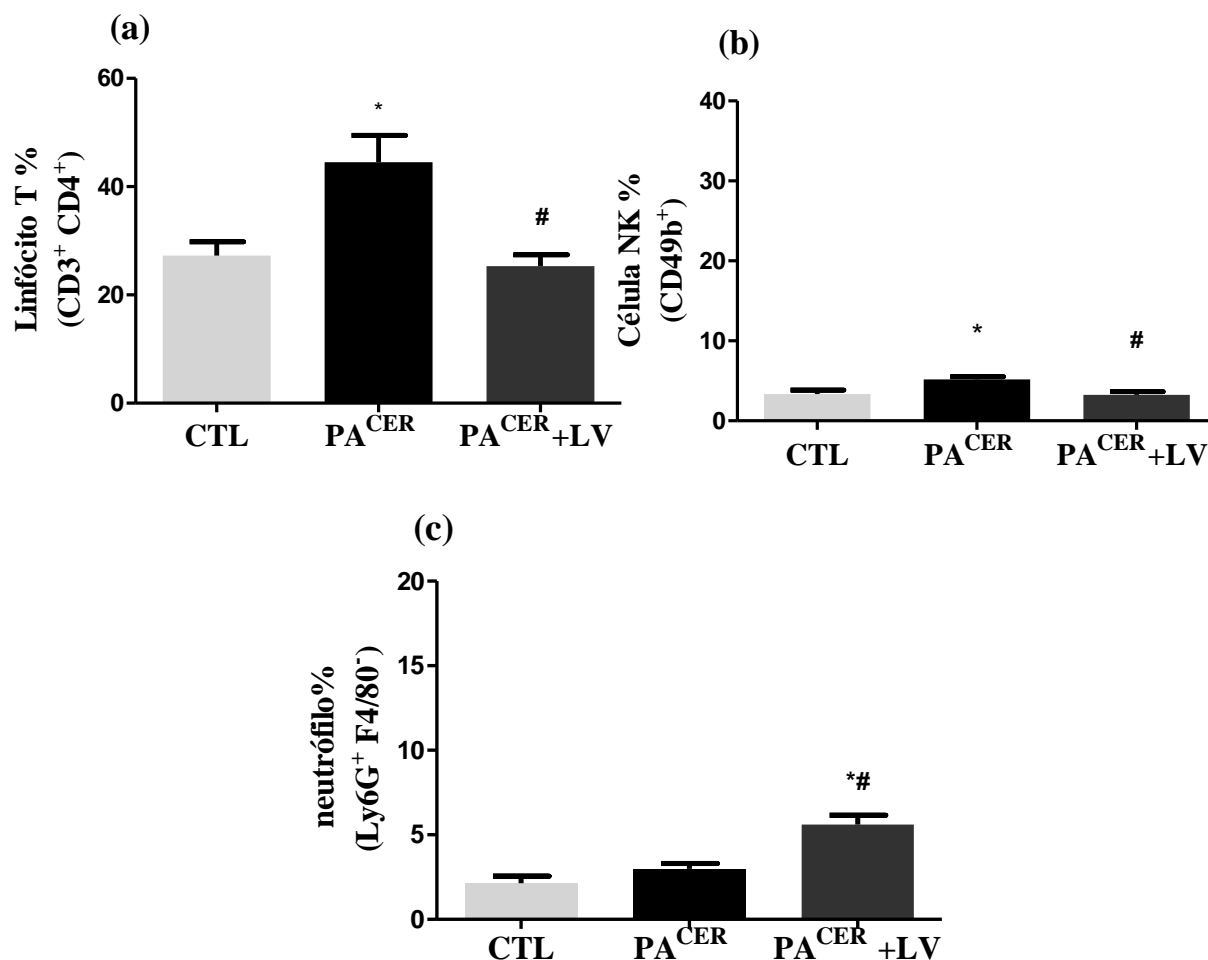


Figura 8. Percentual diferencial das células presentes na PerC após 12h de PA leve induzida por ceruleína (100µg/Kg). (a) linfócitos T; (b) linfócitos NK; (c) neutrófilos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 se PA^{CER} e/ou PA^{CER}+LV ≠ CTL; #p<0,05 PA^{CER}+LV ≠ PA^{CER}.

4.3 Concentração de amilase no soro de animais com PA leve.

A **Figura 9** mostra a concentração de amilase (u/dL) no soro dos animais com PA leve. Observamos que o grupo PA^{CER} (5165 ± 463,6) de fato apresentou aumento na concentração de amilase, quando comparado ao CTL (3092,78 ± 264,6), enquanto que o grupo PA^{CER}+LV (3849 ± 242,7) apresentou redução na concentração da enzima após a intervenção.

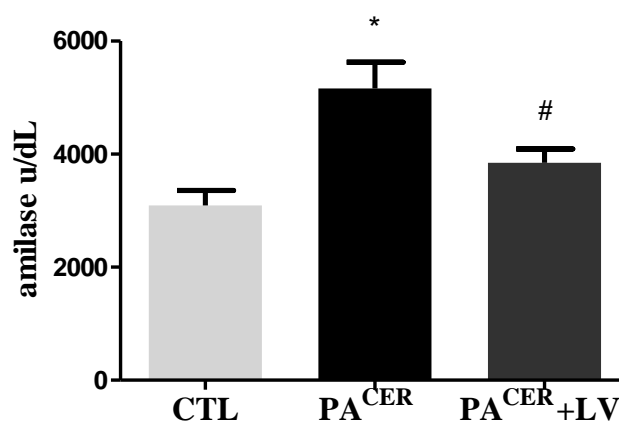


Figura 9. Concentração de amilase (u/dL) no soro dos animais após 12h de PA. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} \neq CTL; # $p < 0,05$ se PA^{CER}+LV \neq PA^{CER}.

4.4 Perfil de citocinas inflamatórias na PerC e soro após 12 horas de PA leve.

A indução da pancreatite por ceruleína não alterou as populações celulares da PerC, tal como não interferiu no conteúdo de citocinas no local. Entretanto, foi constatada a presença de macrófagos SPM como população celular majoritária na PerC dos animais do grupo PA^{CER}+LV. Também se constatou na PerC deste grupo aumento da concentração (pg/mL) de IL1- β [Fig. 10 (A1)]; IL-4, citocina liberada por macrófagos do tipo M2 (reparadores de dano) Fig. 10 (B1; B2); e IL-6 [Fig. 11 (A1)]. No soro não houve elevação de citocinas inflamatórias em nenhum dos grupos estudados, no entanto, observou-se que as citocinas MCP-1 e MIP2 estavam reduzidas no soro [Figura 11 (B2; C2)] e MCP1 elevada na PerC do grupo PA^{CER}+LV [Figura 11 (B1)].

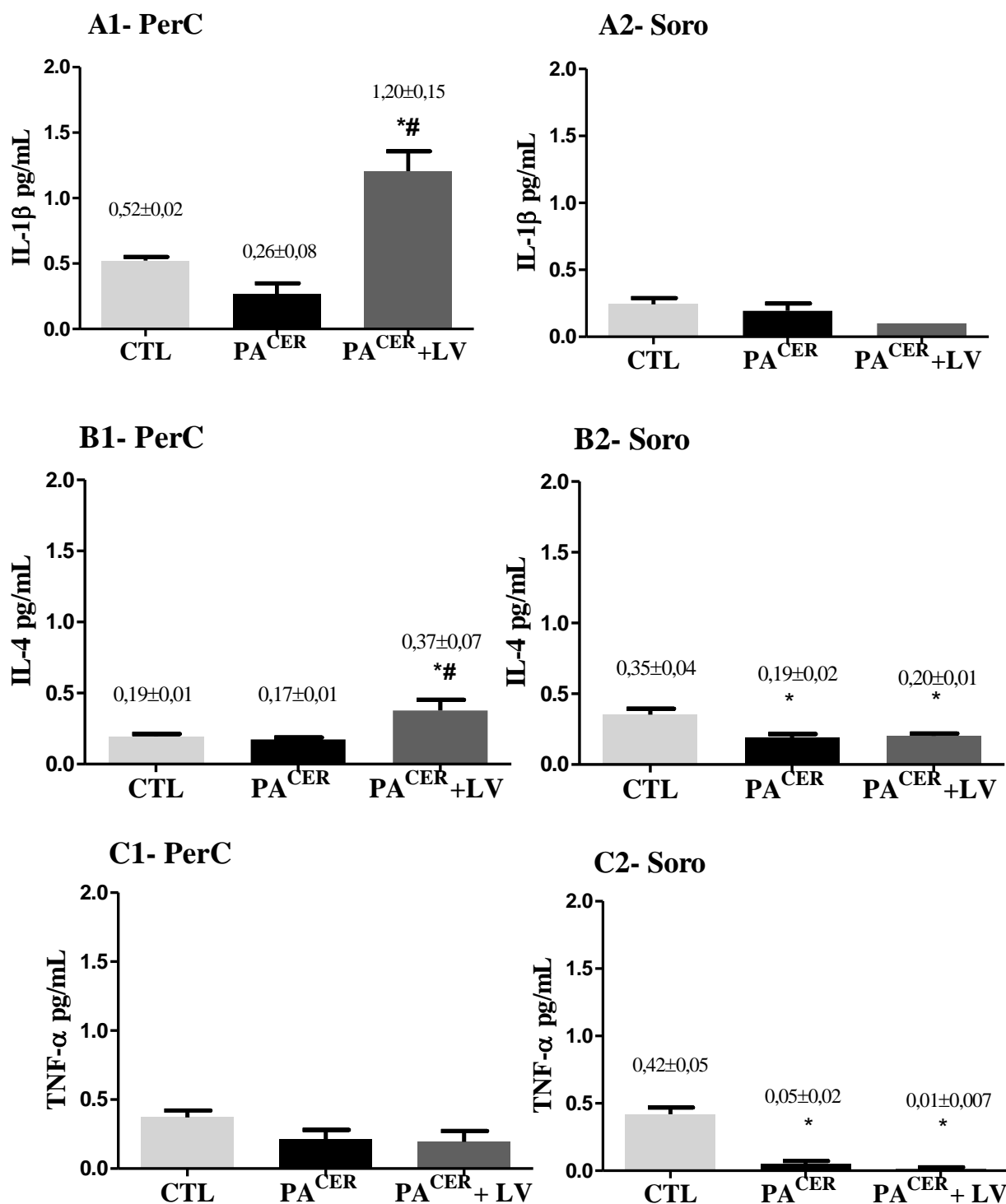


Figura 10. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA leve. A1- IL-1 β PerC, A2- Soro; B1- IL-4 PerC, B2-Soro; C1- TNF- α PerC, C2-Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou PA^{CER}+LV \neq CTL; # $p < 0,05$ PA^{CER}+LV \neq PA^{CER}.

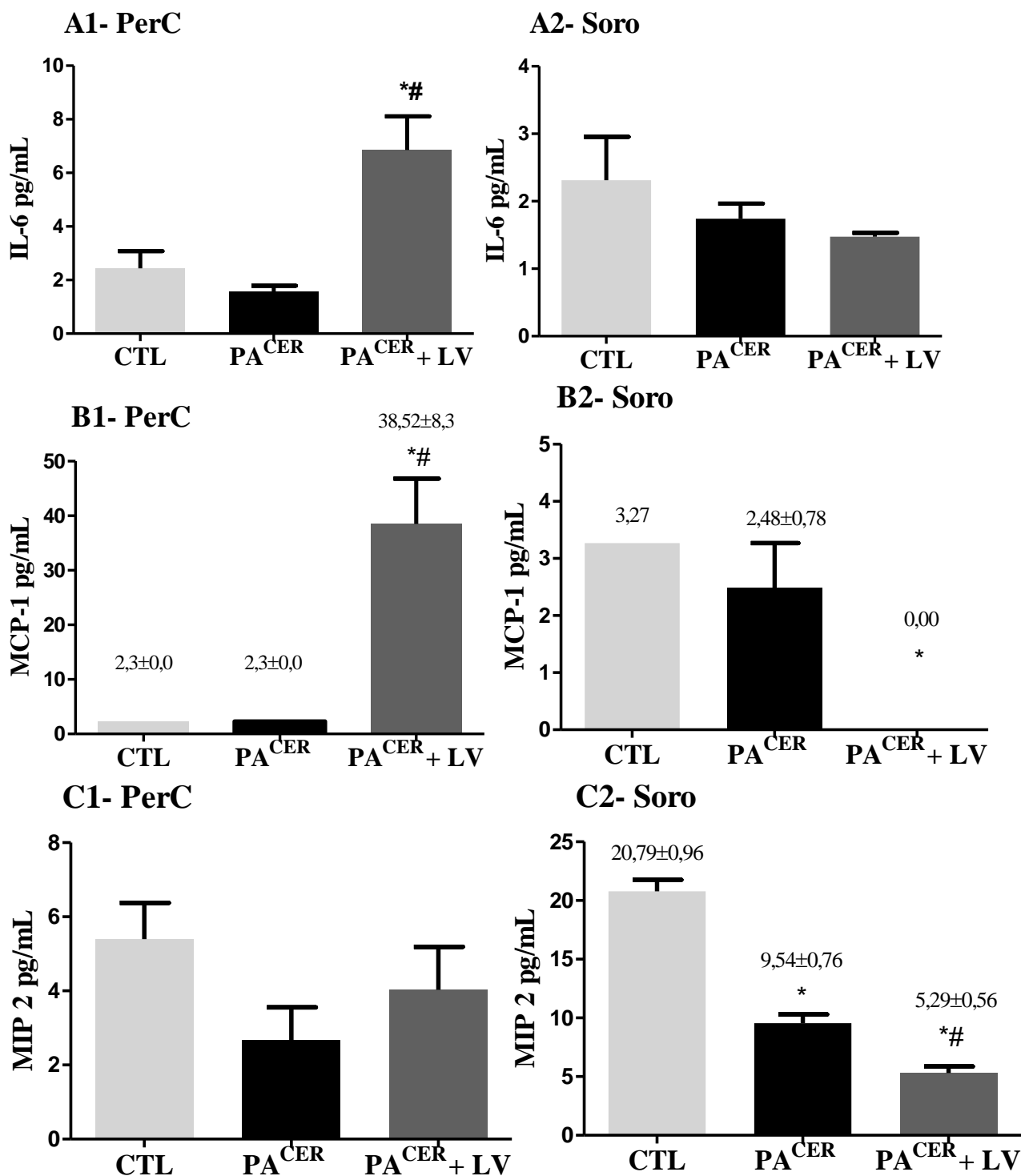


Figura 11. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA leve. A1- IL-6 PerC, A2- Soro; B1- MCP-1 PerC, B2-Soro; C1- MIP-2 PerC, C2-Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou PA^{CER}+LV \neq CTL; # $p < 0,05$ PA^{CER}+LV \neq PA^{CER}.

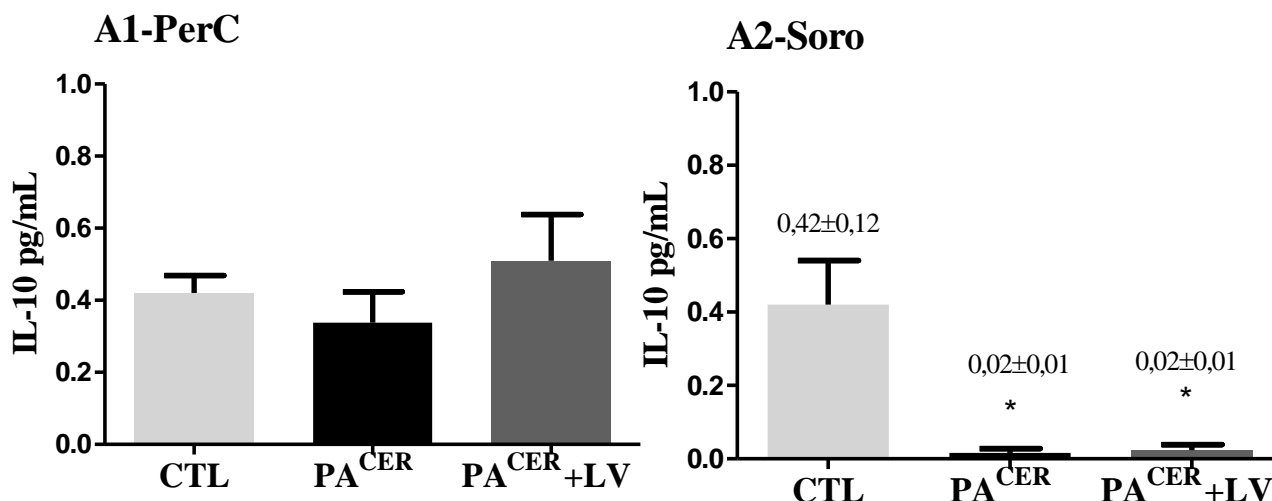


Figura 12. Concentração de IL-10 (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA leve. A1- IL-10 PerC, A2-Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{CER} e/ou PA^{CER}+LV \neq CTL; # $p < 0,05$ PA^{CER}+LV \neq PA^{CER}.

4.5 Lavagem peritoneal contínua na pancreatite aguda grave

Uma hora após a laparotomia e subsequente injeção de ácido taurocólico 2,5% intraducto pancreático, o grupo PA^{AT}+LV apresentou concentração média de $26,9 \pm 7,2 \times 10^5$ /mL de leucócitos totais presentes no lavado, comparado ao grupo SHAM (submetido à LPC) que apresentou $12,6 \pm 5,2 \times 10^5$ /mL. Não houve diferença entre os grupos quanto ao percentual de macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e linfócitos T. Entretanto, observou-se redução considerável da população de macrófagos dos grupos SHAM ($19 \pm 0,02$) e PA^{AT} ($15 \pm 0,04$) comparado ao que se espera encontrar na PerC de animais controle (aproximadamente 40%), conforme já demonstrado na **Figura 4**. Ao analisar o fenótipo desses macrófagos, notamos que todos eram do tipo SPM (CD11b⁺ F8/80⁺), portanto não havia LPM (CD11b^{high} F4/80^{high}). As populações celulares encontradas no líquido obtido da LPC após 1h de PA grave podem ser visualizadas na **Figura 13**.

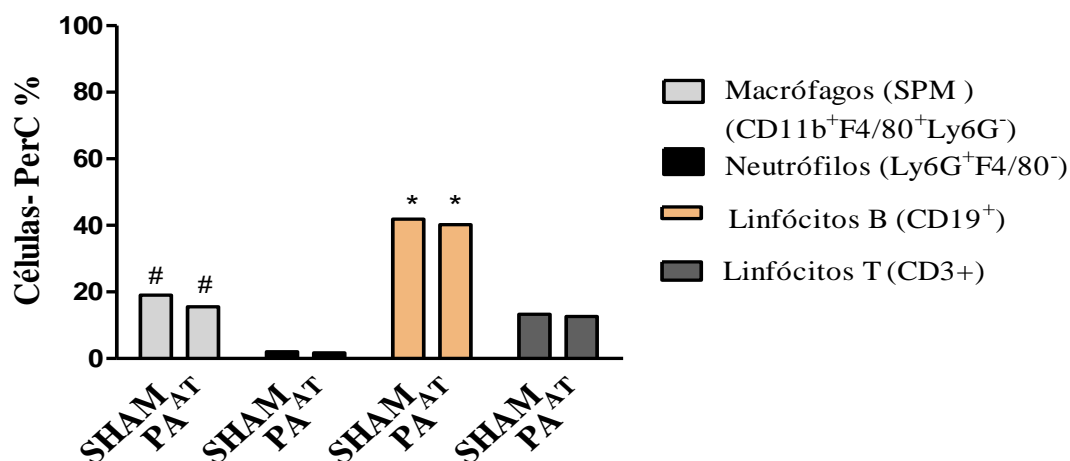


Figura 13. Percentual de macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T presentes na cavidade peritoneal (PerC) uma hora após a indução da PA por ácido taurocólico 2,5% intraducto pancreático. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos celulares foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ linfócitos B \neq macrófagos, neutrófilos e linfócitos T; # $p < 0,05$ macrófagos \neq neutrófilos.

4.6 Curva de sobrevida

Os animais dos grupos PA^{AT} e PA^{AT}+LV foram observados durante 16 horas para acompanhamento da sobrevida, onde constatou-se que ao longo deste tempo todos os animais PA^{AT} que passaram pela LPC sobreviveram à PA grave, enquanto que os que não passaram pela intervenção vieram à óbito (**Figura 14**). Na 4^a hora após a PA, registrou-se dois óbitos; na 8^a hora três óbitos e na 14^a hora dois óbitos. A curva de sobrevida pode ser visualizada na **Figura 14**.

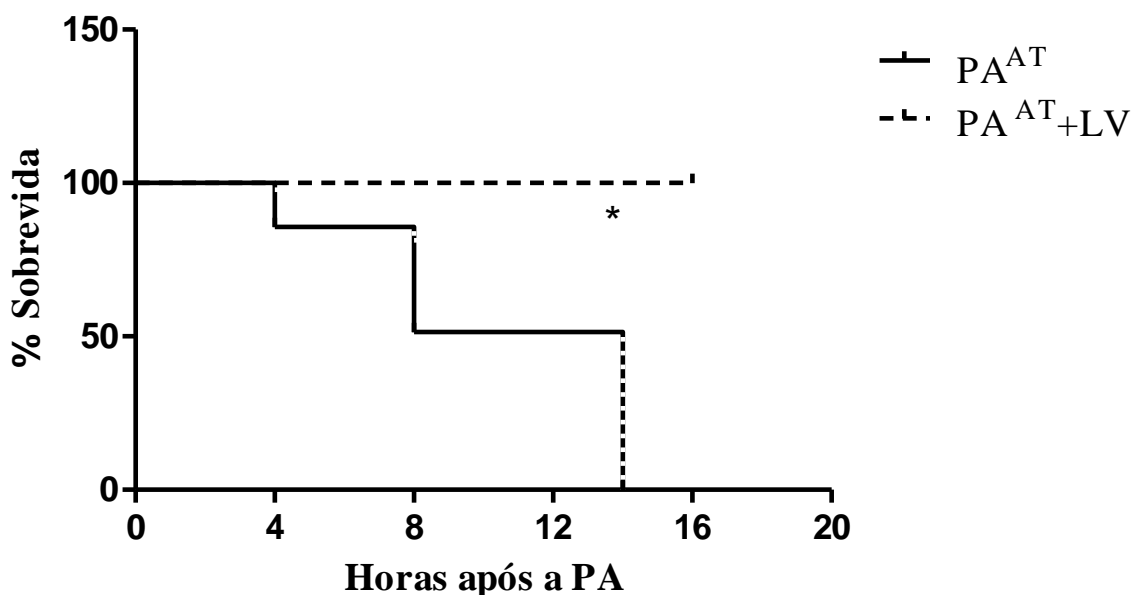


Figura 14. Percentual de sobrevivência dos animais dos grupos PA^{AT} e PA^{AT}+LV acompanhados por 16h após indução da PA grave. A sobrevivência foi de 100% no grupo PA^{AT}+LV (n=9) enquanto no grupo PA^{AT} (n=7) todos os animais vieram à óbito. Log-rank (Mantel-Cox) Test, *p<0,05

4.7 Células presentes no lavado da PerC após 12 horas da PA grave em camundongos.

Após 12 horas da indução da PA por ácido taurocólico 2,5%, a PerC de todos os animais foi lavada para contagem de leucócitos totais. O número de leucócitos totais ($\times 10^5/\text{mL}$) presentes na PerC do grupo PA^{AT}+LV ($40,03 \pm 7,24$) não foi diferente estatisticamente dos demais grupos SHAM ($38,43 \pm 4,133$) e PA^{AT} ($45,23 \pm 6,75$). Observou-se que neste tempo, a pancreatite aguda grave cursou com predomínio de macrófagos na PerC (PA^{AT}: $87,45 \pm 2,0$; SHAM: $55,74 \pm 5,36$). Entretanto, após a LPC, foi constatada uma redução de aproximadamente 28% nos macrófagos do grupo PA^{AT}+LV em relação ao PA^{AT} (PA^{AT}+LV: $60,24 \pm 5,90$), conforme mostrado na **Figura 15 (a)**.

Ao analisar os perfis de linfócitos B, notou-se que a PerC do grupo PA^{AT} apresentou 66,8% menos linfócitos B (CD19⁺) ($20,64 \pm 3,1$) que o grupo SHAM ($6,5 \pm 2,5$), entretanto após a LPC o grupo PA^{AT}+LV aumentou em 58,67% ($15,73 \pm 2,5$) o percentual dessas células em relação ao grupo PA^{AT}. Não houve diferença no percentual de células B1 e B2 e B1b entre os grupos, embora tenha ocorrido aumento de B1a tanto no grupo PA^{AT} ($24,56 \pm 2,134$) quanto no PA^{AT}+LV ($21,37 \pm 3,76$) em relação ao SHAM ($8,38 \pm 0,61$). Os linfócitos T (CD4⁺) estavam reduzido em percentual nos dois grupos com pancreatite aguda [PA^{AT} ($0,80 \pm 0,19$);

PA^{AT}+LV (0,77±0,21)] em relação ao SHAM (1,88±0,46). Já as células NK estavam duas vezes mais aumentadas no grupo PA^{AT} (3,44±0,75) que no SHAM (1,36±0,14), enquanto que após a intervenção com a LPC ocorreu queda desse percentual nos animais PA^{AT}+LV (1,37±0,17).

A identificação dessas células com base em seu fenótipo de superfície pode ser verificada na **Figura 15, e 16 e 17**.

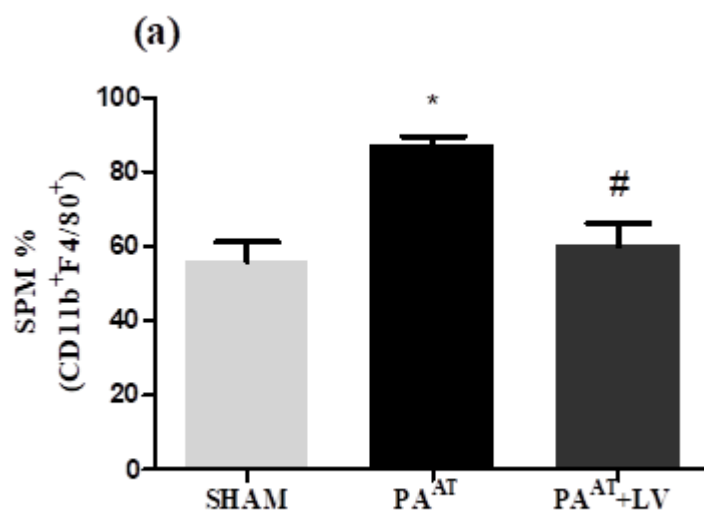


Figura 15. Percentual diferencial de macrófagos presentes na PerC após 12h de PA grave induzida por ácido taurocólico 2,5%. **(a)** “Small peritoneal macrophage”-SPM (CD11b+F4/80+); As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-

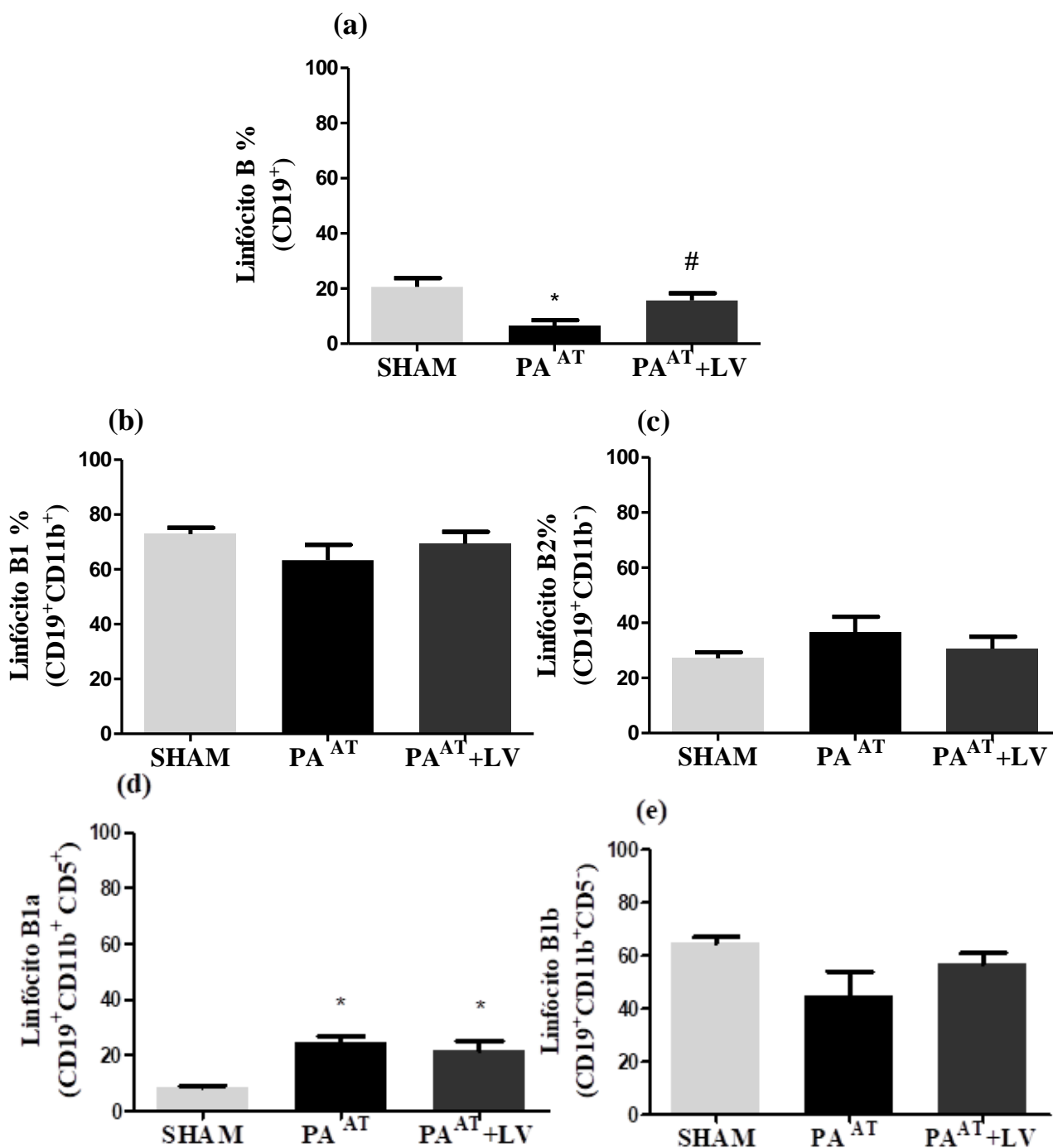


Figura 16. Percentual diferencial das linfócitos B presentes na PerC após 12h de PA grave induzida por ácido taurocólico 2,5%. **(a)** B (CD19⁺); **(b)** B1 (CD19⁺ CD11b⁺); **(c)** B2 (CD19⁺ CD11b^{neg}); **(d)** B1a (CD19⁺ CD11b⁺ CD5⁺); **(e)** (CD19⁺ CD11b⁺ CD5^{neg}). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ PA^{AT} \neq CTL; # $p < 0,05$ PA^{AT}+LV \neq PA^{AT}.

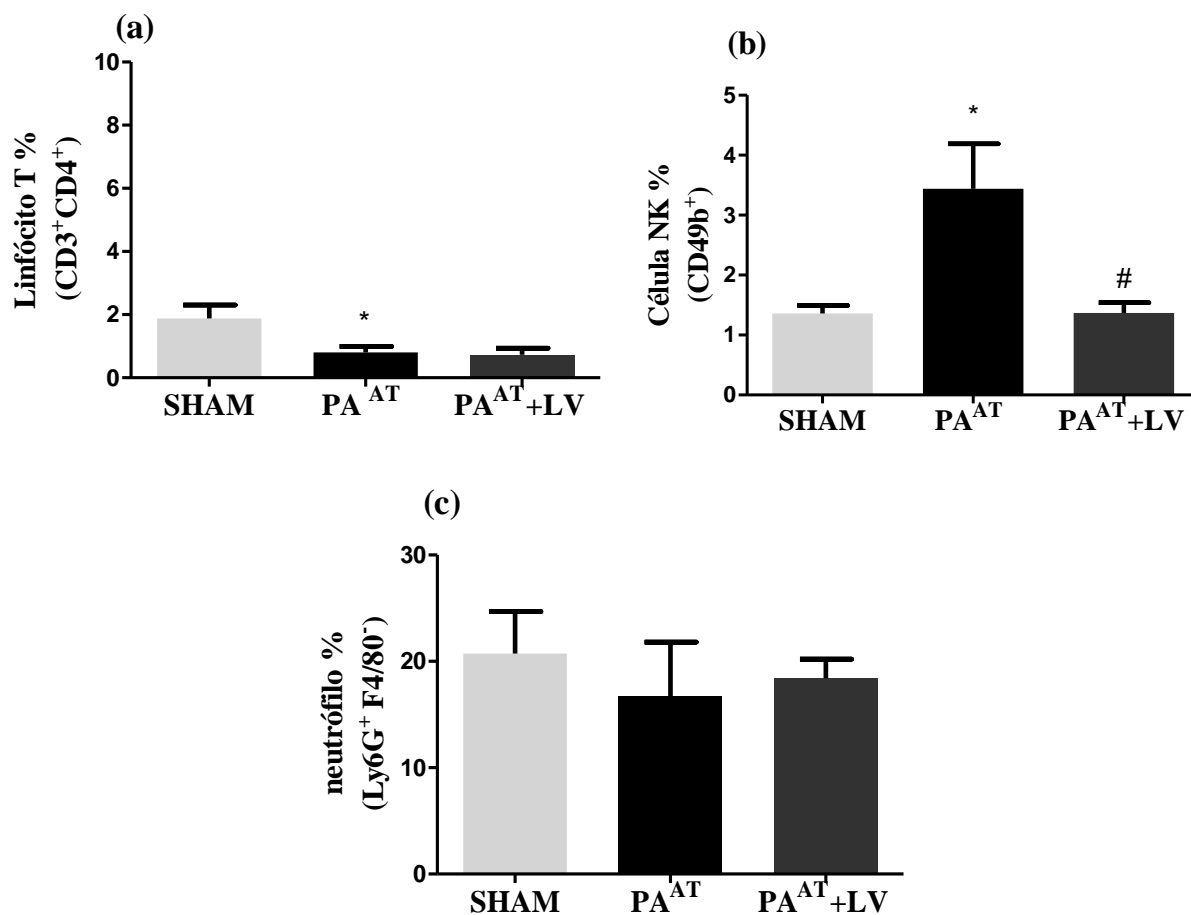


Figura 17. Percentual diferencial de células presentes na PerC após 12h de PA grave induzida por ácido taurocólico 2,5%. (a) Linfócitos T (CD3⁺ CD4⁺); (b) Linfócitos NK (CD49b⁺); (c) neutrófilos (Ly6G⁺ F4/80^{neg}). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05 PA^{AT} ≠ CTL; #p<0,05 PA^{AT}+LV ≠ PA^{AT}.

4.5 Concentração de amilase em animais com PA grave.

A **Figura 18** mostra a concentração de amilase (u/dL) no soro dos animais com PA grave. Observamos que o grupo PA^{AT} de fato apresentou aumento na concentração de amilase (6194 ± 336,7 u/dL), quando comparado ao SHAM (3845 ± 135,7 u/dL), enquanto que o grupo PA^{AT}+LV (4094 ± 453,7 u/dL) apresentou redução na concentração da enzima após a intervenção.

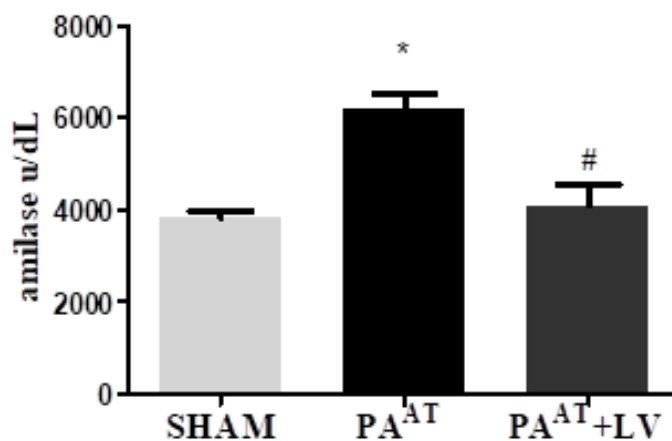


Figura 18. Concentração de amilase (u/dL) no soro dos animais após 12h de PA. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os tipos grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se $PA^{AT} \neq CTL$; # $p < 0,05$ $PA^{AT}+LV \neq PA^{AT}$.

4.6 Perfil de citocinas inflamatórias na PerC e soro após 12 horas de PA grave.

A indução da pancreatite por taurocolato de sódio alterou as populações celulares da PerC, tal como interferiu no conteúdo de citocinas no local. Embora a PerC dos animais de todos os grupos tenha apresentado predomínio de SPM após a laparotomia, o grupo que $PA^{AT}+LV$ apresentou redução de citocinas inflamatórias no lavado peritoneal analisado 12 horas após a PA (Figura 19, 20 e 21).

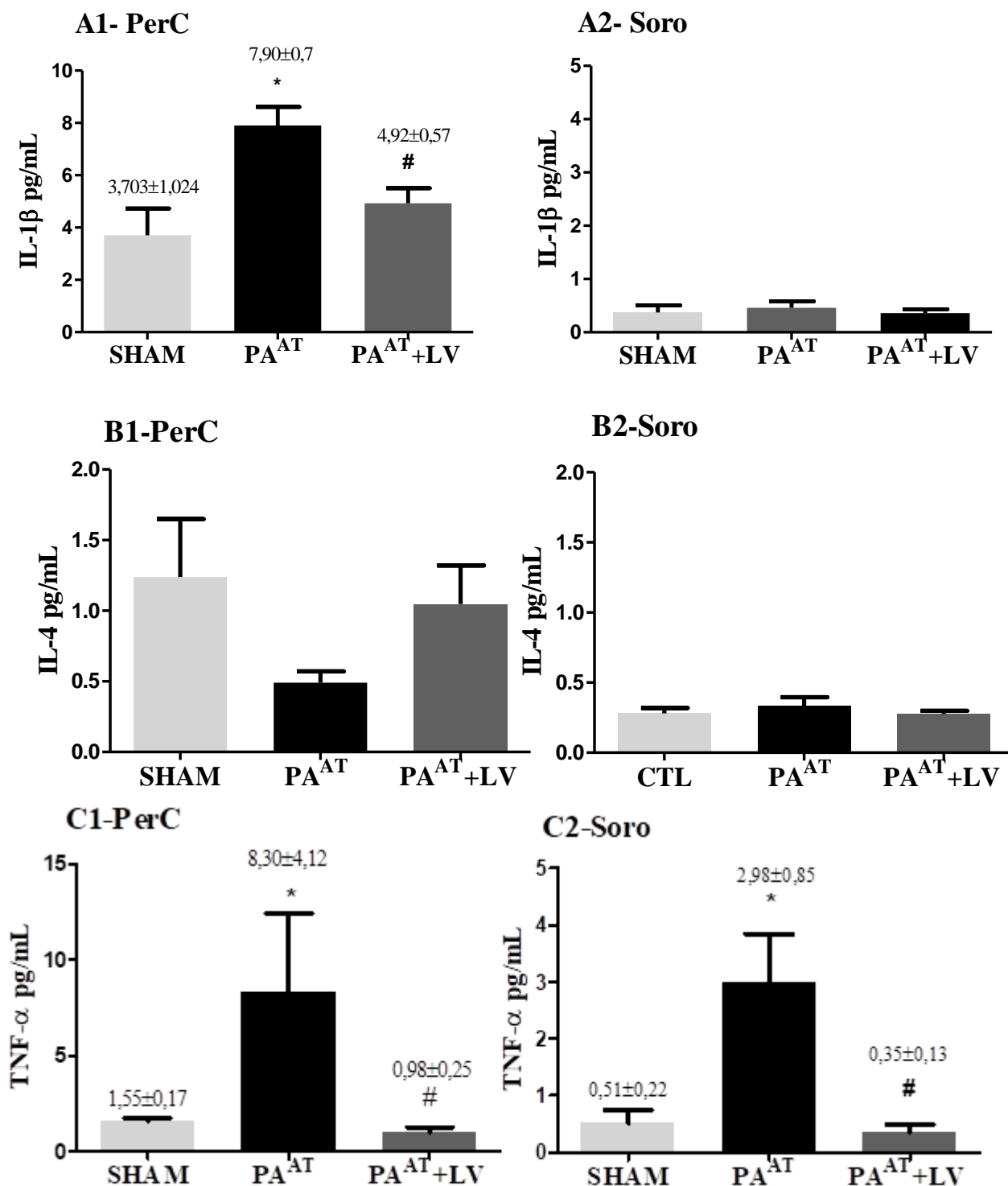


Figura 19. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA grave. (A1) IL-1β PerC, (A2) IL-1β Soro; (B1) IL-4 PerC, (B2) IL-4 Soro; (C1) TNF-α PerC, (C2) TNF-α Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ PA^{AT} ≠ CTL; # $p < 0,05$ PA^{AT}+LV ≠ PA^{AT}.

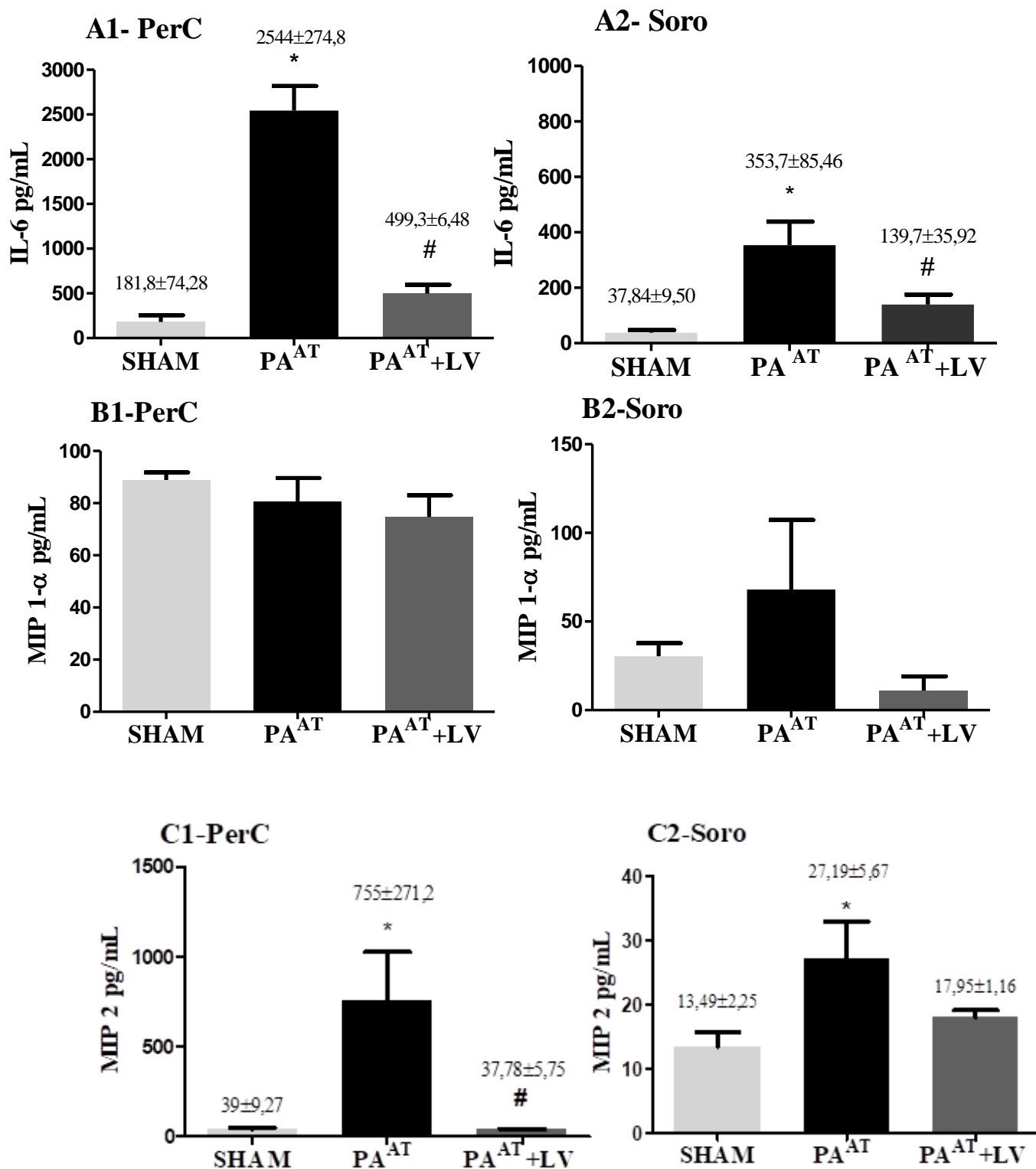


Figura 19. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA grave. (A1) IL-6 PerC, (A2) IL-6 Soro; (B1) MIP-1 PerC, (B2) MIP-1 Soro; (C1) MIP-2 PerC, (C2) MIP-2 Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ PA^{AT} ≠ CTL; # $p < 0,05$ PA^{AT}+LV ≠ PA^{AT}.

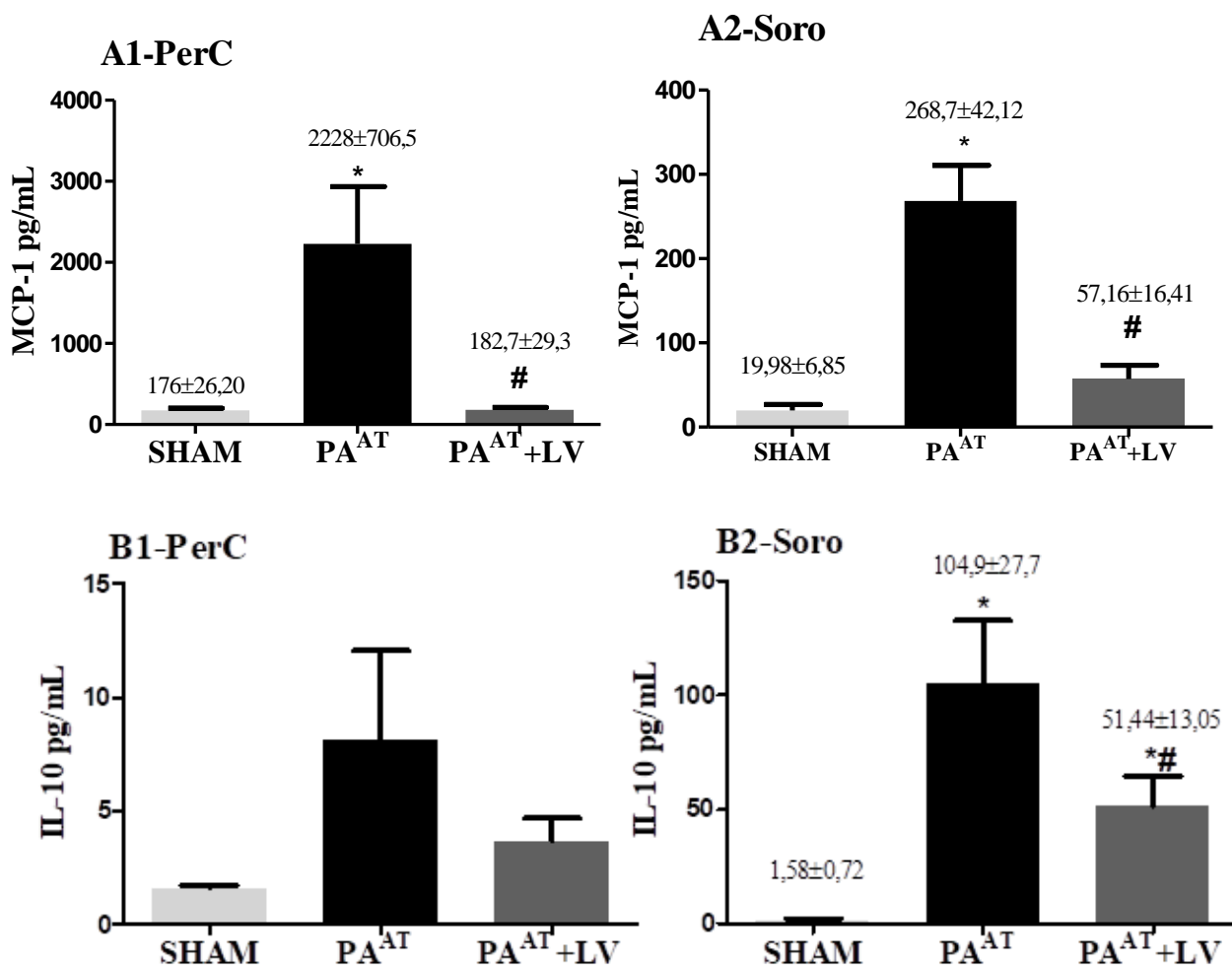


Figura 20. Concentração de citocinas inflamatórias (pg/mL) na PerC e soro após 12 horas de PA grave. (A1) MCP-1 PerC, (A2) MCP-1 Soro; (B1) IL-10 PerC, (B2) IL-10 Soro. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida de pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ se PA^{AT} e/ou PA^{AT}+LV \neq CTL; # $p < 0,05$ PA^{AT}+LV \neq PA^{AT}.

5 DISCUSSÃO

A influência do conteúdo de células peritoneais sobre o quadro da pancreatite aguda foi pouco estudada, assim como os protocolos de indução da PA leve por injeção de ceruleína são em geral por via intraperitoneal. Desse modo, este é o primeiro estudo a abordar a pancreatite aguda leve em que o protocolo para indução da PA (via subcutânea e endovenosa) preservou a cavidade peritoneal, permitindo então uma análise mais isolada das alterações celulares durante a condição, excluindo o viés de uma peritonite secundária. No presente estudo, fornecemos evidências de que o conteúdo de células peritoneais varia de acordo com o estágio da pancreatite aguda, de modo que intervir com uma lavagem peritoneal contínua pode alterar o fenótipo dessas células dependendo do momento que este recurso seja utilizado.

Após a quarta injeção subcutânea de ceruleína e ao tempo que os animais induzidos com PA passaram pela LPC, verificamos que as células presentes no líquido retirado não diferiram em fenótipo e percentual relativo de uma condição controle. Entretanto, doze horas após a indução da PA fomos surpreendidos pela mudança de fenótipo dos macrófagos peritoneais do grupo que foi submetido à LPC, sendo quase que exclusivamente do tipo *small peritoneal macrophage* (SPM), enquanto que os *large peritoneal macrophage* (LPM - residentes) pareciam ter “desaparecido” neste grupo.

A “reação de desaparecimento de macrófagos” (*macrophage disappearance reaction*-MDR) é bem conhecida, mas pouco compreendida. Ela foi mencionada na literatura pela primeira vez no ano de 1965¹²⁹, mas com o passar dos anos outros autores também referenciaram¹³⁰⁻¹³². Os LPM são o subconjunto único de macrófagos peritoneais que desaparece da PerC, e este evento pode ser atribuído não à morte celular, mas à migração para o omento^{100,101}. O desaparecimento dos LPM em resposta a estímulos inflamatórios é acompanhado por um aumento nos números de SPM^{96,99,101,133} e tem sido correlacionado com a renovação e a melhoria das condições imunológicas da PerC. Um estudo publicado por Saeki et al. (2012)¹³⁴ mostrou que a deleção de macrófagos peritoneais por injeção de lipossomas de clodronato 24 horas antes da administração da ceruleína (ip) reduziu os danos no pâncreas. O autor associou essa melhora ao menor percentual de células CD11b^{high}Gr-1^{low} (LPM) presentes no pâncreas. Em nosso estudo, o grupo PA^{CER}+LV também apresentou menor percentual de linfócitos B na PerC, e quando verificada a subclassificação B1(a e b) e B2, apresentou mais B2 que B1, já dentro do conjunto de B1, apresentou redução de B1a

e aumento de B1b. As células B1 são geradas durante a vida fetal e neonatal, e a maioria dessa população é mantida por auto renovação, embora ainda exista um potencial limitado para a produção dessa célula a partir de progenitores da medula óssea. Já as células B2 são produzidas continuamente na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas ao longo da vida e migram para os órgãos linfóides secundários como células B imaturas. Nestes órgãos, eles se diferenciam em células foliculares e da zona B marginal; as células B2 reconhecem antígenos proteicos e são descritas por atuarem de forma dependente de linfócitos T⁹⁰. A seleção de células B1 é aprimorada por uma forte sinalização de BCR (receptor de células B), que pode ser espontânea ou induzida por auto antígenos, logo, atua de forma T independente. O subconjunto B1b reconhece uma gama mais ampla de antígenos e podem formar células B de memória, já as células B1a são fontes naturais de IgM em condições estacionárias¹²¹. Em síntese, a lavagem peritoneal em animais com pancreatite aguda leve promoveu o repovoamento da PerC por macrófagos do tipo SPM que podem ter migrado da circulação juntamente com neutrófilos e linfócitos B1b e B2 após 12h de PA, sugestivo de uma resposta imunológica possivelmente dependente de linfócitos T, ainda que estas células tenham reduzido em percentual após a LPC.

O modelo de indução de pancreatite por doses supramáximas de ceruleína não leva à mortalidade, então para entender melhor o desfecho da LPC nesse modelo, foi feita a dosagem de amilase no soro e quantificação de citocinas inflamatórias na PerC e soro após 12 horas de PA. Verificamos que houve redução da concentração de amilase no soro, que alguns estudos associam com melhor prognóstico na PA¹³⁵. Na PerC ocorreu elevação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e MCP-1) estavam elevadas no grupo PA^{CER}+LV, ainda que IL-4, interleucina de perfil M2 (anti-inflamatória), também estivesse elevada.

Tanto o SPM quanto o LPM podem ser fonte de citocinas pró e anti-inflamatórias, dependendo do microambiente. Os SPMs parecem desenvolver um perfil pró-inflamatório em resposta a estímulos *in vitro*, produzindo elevadas concentrações de TNF- α , MIP-1 α e RANTES em resposta ao LPS, enquanto os LPMs produzem concentrações abundantes de G-CSF, GM-CSF e KC em resposta ao mesmo estímulo⁹⁶. O predomínio de SPM na PerC dos animais que passaram pela LPC pode estar relacionado ao fato de que no momento da lavagem as células peritoneais ainda se encontravam em homeostase, ou seja, com as populações majoritárias de linfócitos B1 e macrófagos do tipo LPM, mas a remoção de LPM's e de linfócitos B1 pode ter exercido estímulo para o repovoamento por SPM e

linfócitos B2 encontrados 12 horas após. A elevação da concentração da quimiocina MCP-1 (CCL-2), na PerC do grupo PA^{CER}+LV reforça a teoria de que os SPM foram estimulados a migrar da circulação para a PerC, assim como a presença majoritária de SPM pode ter sido a causa do aumento da concentração de outras citocinas e quimiocinas inflamatórias observadas neste grupo.

Sabe-se que as células pertencentes à órgãos vizinhos ao pâncreas têm seu fenótipo alterado no curso da doença ¹⁰³. Um trabalho publicado por XU et al. (2014), mostrou que os macrófagos hepáticos modificam seu fenótipo de M1 para M2, mediante estímulo com IL-4 e células Treg *in vivo e in vitro*, promovendo um efeito protetor em camundongos com pancreatite aguda grave ¹³⁶. Outro estudo verificou que macrófagos gástricos são responsáveis pela lesão da mucosa gástrica quando ativados durante a pancreatite aguda grave ¹³⁷. Em 2009, Gea-Sorlí e Closa ¹³⁸ publicaram um estudo que investigou especificamente fenótipos de macrófagos durante a progressão de um modelo de pancreatite aguda e SIRS, induzida por taurocolato de sódio a 5% em ratos. Os resultados desse estudo mostraram que o tratamento com IL-4 e IL-13, interleucinas de perfil M2, reverteu a indução de pancreatite *in vitro*, mas falhou na modulação da ativação *in vivo* em macrófagos peritoneais.

O modelo de pancreatite aguda grave necrotizante induzida por ácido taurocólico está associado com elevada mortalidade em curto período de tempo. Ao avaliar os efeitos da lavagem peritoneal nesse modelo tivemos um dado surpreendente: em dezesseis horas de observação todos animais do grupo PA^{AT}+LV sobreviveram à gravidade da PA, enquanto que o grupo PA^{AT} teve 100% de óbito durante o mesmo tempo.

O efeito da lavagem peritoneal na sobrevida de pacientes com quadro de pancreatite aguda grave necrotizante já é conhecido. Um estudo de meta-análise e revisão sistemática publicado por Li et al. (2016)¹¹⁹ baseado em uma amostra de 889 pacientes de 15 estudos concluiu que a lavagem peritoneal diminuiu significativamente a mortalidade de pacientes com pancreatite aguda grave.

Um grupo de estudo da FMUSP publicou um trabalho sobre os efeitos da lavagem peritoneal em modelo de pancreatite aguda induzido por ácido taurocólico em ratos. Neste trabalho foi demonstrado que a lavagem peritoneal após a indução da PA grave reduziu a concentração de citocinas inflamatórias no soro desses animais (TNF- α e IL-6) e elevou IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória. Além disso, a expressão de ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase indutível no pâncreas apresentou-se reduzida⁷⁵. Partindo desses

achados, surgiu o interesse de caracterizar as células presentes na PerC de animais com pancreatite aguda grave tanto no líquido obtido da LPC quanto após 12h de PA.

Neste trabalho foi verificado que após 1h de PA^{AT}, a maioria das células presentes no lavado eram linfócitos B (40%), já não havia mais LPM e os SPM já estavam povoando o local (20%). Doze horas após a PA foi encontrada intensa leucocitose na PerC de todos os grupos, que foi atribuída à laparotomia, uma vez que todos os animais, independentemente de estar ou não com pancreatite apresentaram aumento na celularidade. Nesse mesmo tempo, foi constatada redução de amilase no soro dos animais que passaram pela LPC, assim como foi constatado que a pancreatite aguda grave causa aumento de macrófagos SPM e que intervir com a lavagem peritoneal contínua reduz a quantidade dessas células na região em 20%. Um trabalho publicado por Mikami et al. (2003)¹³⁹ revelou que macrófagos peritoneais estão envolvidos na progressão da pancreatite aguda, mas como nessa época ainda não tinham sido descritos os subtipos de macrófagos que poderiam ser encontrados na PerC, essa questão ficou em aberto. Nesse trabalho, foi feita uma depleção de macrófagos injetando bisfosfonato de diclorometileno encapsulado em lipossomas (Cl₂MBP lipossoma), e 48h após foi realizada a indução da pancreatite aguda por ácido taurocólico (3%). Entre os resultados obtidos estão: redução do número de neutrófilos, concentração de citocinas inflamatórias no lavado peritoneal e soro, volume de ascite e redução do dano pulmonar e pancreático. Resultados semelhantes em relação a concentração de citocinas inflamatórias no lavado peritoneal e soro após lavagem peritoneal foram obtidos em nosso estudo. Considerando que a pancreatite aguda grave cursa com mau prognóstico quando apresenta elevação de citocinas inflamatórias no soro e líquido ascítico^{38,140,141}, alternativas simples que consigam reverter este quadro devem ser consideradas relevantes. Um estudo conduzido por Liu et al. (2018) mostrou que a drenagem de líquido ascítico (paracentese) nesse tipo de PA promoveu mudança no fenótipo de macrófagos (transição de M1 para M2), reduziu significativamente os escores histopatológicos e os níveis de amilase, lipase, fator de necrose tumoral- α e interleucina (IL) -1 β , L-selectina, elevou as citocinas IL-4 e IL-10 e aumentou a expressão da proteína anti-inflamatória Arg-1 no pâncreas de ratos¹⁴².

Podemos sugerir, portanto, que o efeito positivo da lavagem peritoneal contínua na redução da inflamação na PerC e soro está relacionado a redução (%) de macrófagos do tipo SPM inflamatórios e possível à remoção de citocinas inflamatórias, tal como filtração do excesso de amilase no soro, refletindo, portanto, na ausência de óbitos durante as 16 horas observadas.

6 CONCLUSÕES

Nesse estudo foram caracterizadas as células presentes no peritônio durante a lavagem peritoneal em animais com pancreatite aguda leve e grave e 12 horas após a PA nos dois modelos. Verificamos que nas primeiras 12 horas de PA leve não há alteração no conteúdo de células peritoneais quando comparado a um animal sem pancreatite. No entanto, a lavagem peritoneal removeu as células residentes do peritônio e conseqüentemente induziu o repovoamento de células na região por macrófagos SPM, possivelmente oriundos de monócitos da circulação. O microambiente da PerC pós LPC apresentou aumento na concentração de citocinas inflamatórias, mas também de IL-4. Mesmo que a lavagem tenha reduzido a concentração de amilase no soro nesse modelo, os resultados sugerem que uma vez que não haja alteração na composição celular do peritônio, não há necessidade dessa intervenção.

No modelo de PA grave, verificamos que na primeira hora já havia diferença na proporção e presença de células que são esperadas de encontrar na PerC. Os LPM já não estavam presentes e os SPM eram a população majoritária. Doze horas após verificou-se redução de 20% de SPM nos animais que passaram pela lavagem contínua, tal como de citocinas e quimiocinas inflamatórias.

A lavagem peritoneal contínua reduziu a concentração de amilase no soro desses animais e proporcionou uma sobrevida de 100% nos animais com PA grave que passaram pelo procedimento.

Assim, a lavagem peritoneal pode ser uma alternativa muito útil no manejo da PA em estágios mais graves, quando já é possível notar alterações na composição celular da PerC.

6.1 Resumo gráfico

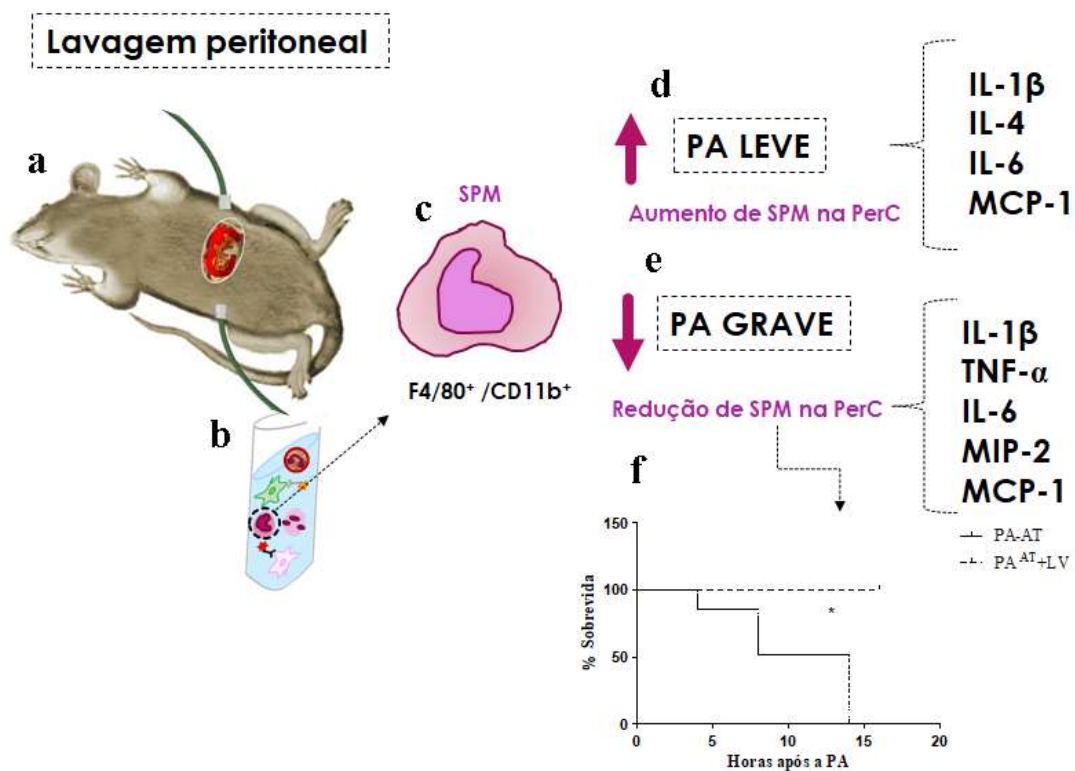


Figura 21. Resumo gráfico dos efeitos da lavagem peritoneal na PA leve e grave. (a) Esquema representativo da lavagem peritoneal contínua; (b) suspensão de células; (c) macrófago SPM; (d) Aumento de SPM e parâmetros inflamatórios na PerC do grupo PA^{CER}+LV após 12 horas de PA leve; (e) Redução de SPM e parâmetros inflamatórios na PerC do grupo PA^{AT}+LV após 12 horas de PA grave; (f) 100% de sobrevivência dos animais do grupo PA^{AT}+LV.

7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Conforme descrito na discussão, a reação de desaparecimento de macrófagos na presença de estímulos inflamatórios é um evento conhecido, mas pouco compreendido. Alguns estudos sugerem que os LPM migram para o omento nessas situações, mas isso não foi esclarecido. Verificamos que ao submeter animais com PA leve à LPC, esses animais apresentaram redução dos macrófagos de tipo LPM, tal como todos os animais submetidos à laparotomia no modelo de indução de PA grave por ácido taurocólico. Assim, investigar a dinâmica dessas células em compartimentos diversos e em exposição a diferentes estímulos pode ser explorado.

Outra sugestão é a realização da marcação das citocinas juntamente com as células durante a etapa de imunofenotipagem e citometria de fluxo, o que não foi possível nesse estudo devido a limitação de lasers de nosso equipamento.

REFERÊNCIAS

1. Manohar M, Verma AK, Venkateshaiah SU, Sanders NL, Mishra A. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2017;8(1):10-25.
2. Leppäniemi A, Tolonen M, Tarasconi A, et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis. *World Journal of Emergency Surgery* 2019;14(1):1-20.
3. Xiao AY, Tan ML, Wu LM, et al. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2016;1(1):45-55.
4. Huckle T, You RQ, Casswell S. Socio-economic status predicts drinking patterns but not alcohol-related consequences independently. *Addiction* 2010;105(7):1192-202.
5. Roberts SE, Akbari A, Thorne K, Atkinson M, Evans PA. The incidence of acute pancreatitis: impact of social deprivation, alcohol consumption, seasonal and demographic factors. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38(5):539-48.
6. Fan JJ, Ding L, Lu YY, Zheng JY, Zeng Y, Huang CL. Epidemiology and Etiology of Acute Pancreatitis in Urban and Suburban Areas in Shanghai: A Retrospective Study. *Gastroenterology Research and Practice* 2018.
7. Reid GP, Williams EW, Francis DK, Lee MG. Acute pancreatitis: A 7 year retrospective cohort study of the epidemiology, aetiology and outcome from a tertiary hospital in Jamaica. *Annals of Medicine and Surgery* 2017;20:103-108.
8. Gapp J, Hall AG, Walters RW, Jahann D, Kassim T, Reddymasu S. Trends and Outcomes of Hospitalizations Related to Acute Pancreatitis Epidemiology From 2001 to 2014 in the United States. *Pancreas* 2019;48(4):548-554.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. Características gerais da população. 2019 [cited 2019 oct 29]. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>.

10. DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Informações de Saúde. 2014. [cited 2019 oct 29]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/publicacoes/pdti/2014-2015-pdti>.
11. Lúcio DS, Borghesi SA. Estudo clínico-epidemiológico das pancreatites em um hospital de referência terciária entre 2013 e 2014. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba* 2016;18.
12. Álvares LGGS, Silva AF, Silva ALS. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com pancreatite aguda em um hospital público de São Luís, Maranhão. *Revista de Pesquisa em Saúde* 2013;14.
13. van Santvoort HC, Bakker OJ, Bollen TL, et al. A conservative and minimally invasive approach to necrotizing pancreatitis improves outcome. *Gastroenterology* 2011;141(4):1254-63.
14. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* 2013;62(1):102-11.
15. Werge M, Novovic S, Schmidt PN, Gluud LL. Infection increases mortality in necrotizing pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Pancreatology* 2016;16(5):698-707.
16. Greenberg JA, Hsu J, Bawazeer M, et al. Clinical practice guideline: management of acute pancreatitis. *Can J Surg* 2016;59(2):128-40.
17. Afghani E, Pandol SJ, Shimosegawa T, et al. Acute Pancreatitis—Progress and Challenges: A Report on an International Symposium. *Pancreas* 2015;44(8):1195-210.
18. Petrov MS, Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019;16(3):175-184.
19. Ke L, Li J, Hu P, Wang L, Chen H, Zhu Y. Percutaneous Catheter Drainage in Infected Pancreatitis Necrosis: a Systematic Review. *Indian J Surg* 2016:221-8.

20. Papachristou GI, Takahashi N, Chahal P, Sarr MG, Baron TH. Peroral endoscopic drainage/debridement of walled-off pancreatic necrosis. *Ann Surg* 2007;245(6):943-51.
21. Carter CR, McKay CJ, Imrie CW. Percutaneous necrosectomy and sinus tract endoscopy in the management of infected pancreatic necrosis: an initial experience. *Ann Surg* 2000;232(2):175-80.
22. van Santvoort H, Besselink M, Horvath K, et al. Videoscopic assisted retroperitoneal debridement in infected necrotizing pancreatitis. *HPB (Oxford)* 2007;9(2):156-9.
23. Horvath KD, Kao LS, Ali A, Wherry KL, Pellegrini CA, Sinanan MN. Laparoscopic assisted percutaneous drainage of infected pancreatic necrosis. *Surg Endosc* 2001;15(7):677-82.
24. Sorrentino L, Chiara O, Mutignani M, Sammartano F, Brioschi P, Cimbanassi S. Combined totally mini-invasive approach in necrotizing pancreatitis: a case report and systematic literature review. *World J Emerg Surg* 2017;12:16.
25. van Santvoort HC, Besselink MG, Bakker OJ, et al. A Step-up Approach or Open Necrosectomy for Necrotizing Pancreatitis. *N Engl Med* 2010;22:1491-502.
26. Longnecker DS. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* [Internet]. 2014 [cited 2019 oct 30]. Disponible em: <https://www.pancreapedia.org/reviewa/anatomy-and-histology-of-pancreas>.
27. Dolensšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 2015;7:e1024405.
28. Perez S, Pereda J, Sabater L, Sastre J. Pancreatic ascites hemoglobin contributes to the systemic response in acute pancreatitis. *Free Radical Biology and Medicine* 2015;81:145-155.
29. Perez S, Pereda J, Sabater L, Sastre J. Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox Biol* 2015;5:1-14.

30. Wen L, Voronina S, Javed MA, et al. Inhibitors of ORAI1 Prevent Cytosolic Calcium-Associated Injury of Human Pancreatic Acinar Cells and Acute Pancreatitis in 3 Mouse Models. *Gastroenterology* 2015;149(2):481-92.e7.
31. Mukherjee R, Mareninova OA, Odinkova IV, et al. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut* 2016;65(8):1333-46.
32. Sah RP, Dawra RK, Saluja AK. New insights into the pathogenesis of pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29(5):523-30.
33. Kambhampati S, Park W, Habtezion A. Pharmacologic therapy for acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2014;20(45):16868-80.
34. Gao HK, Zhou ZG, Li Y, Chen YQ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with an increased risk of pancreatic necrotic infection in acute pancreatitis: a study in the Chinese population. *Pancreas* 2007;34(3):295-8.
35. 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.
36. Li D, Li J, Wang L, Zhang Q. Association between IL-1beta, IL-8, and IL-10 polymorphisms and risk of acute pancreatitis. *Genet Mol Res* 2015;14(2):6635-41.
37. Pezzilli R, Billi P, Plate L, Bongiovanni F, Morselli Labate AM, Miglioli M. Human pancreas-specific protein/procarboxypeptidase B: a useful serum marker of acute pancreatitis. *Digestion* 1994;55(2):73-7.
38. Lesina M, Wormann SM, Neuhofer P, Song L, Algul H. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. *Semin Immunol* 2014;26(1):80-7.
39. Xu B, Bai B, Sha S, et al. Interleukin-1beta induces autophagy by affecting calcium homeostasis and trypsinogen activation in pancreatic acinar cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(7):3620-31.
40. Rao SA, Kunte AR. Interleukin-6: An Early Predictive Marker for Severity of Acute Pancreatitis. *Indian J Crit Care Med* 2017:424-8.

41. Norman JG, Fink GW, Sexton C, Carter G. Transgenic animals demonstrate a role for the IL-1 receptor in regulating IL-1beta gene expression at steady-state and during the systemic stress induced by acute pancreatitis. *J Surg Res* 1996;63(1):231-6.
42. Julia M, Matthias S and Markus ML. Secretagogue (Caerulein) induced pancreatitis in rodents. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* [Internet]. 2013 [cited 2019 oct 30]. Available from: <https://www.pancreapedia.org/tools/methods/secretagogue-caerulein-induced-pancreatitis-in-rodents>.
43. Daniel P, Lesniowski B, Mokrowiecka A, Jasinska A, Pietruczuk M, Malecka-Panas E. Circulating levels of visfatin, resistin and pro-inflammatory cytokine interleukin-8 in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2010;10(4):477-82.
44. Komar HM, Hart PA, Cruz-Monserrate Z, Conwell DL, Lesinski GB. Local and Systemic Expression of Immunomodulatory Factors in Chronic Pancreatitis. *Pancreas* 2017;46(8):986-93.
45. Rojas JM, Avia M, Martin V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res* 2017;2017:6104054.
46. Gloor B, Todd KE, Lane JS, Rigberg DA, Reber HA. Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice. *J Surg Res* 1998;80(1):110-4.
47. Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, et al. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282(6):G1105-12.
48. Gerber PA, Rutter GA. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2017;26(10):501-518.
49. Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Tang D. Cell Death and DAMPs in Acute Pancreatitis. *Mol Med* 2014:466-77.
50. Machado MCC, Souza HP. The increased severity of acute pancreatitis in the elderly is mainly related to intestinal barrier dysfunction. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2018;17(6):575-577.

51. Wan MH, Huang W, Latawiec D, et al. Review of experimental animal models of biliary acute pancreatitis and recent advances in basic research. *HPB (Oxford)* 2012;14(2):73-81.
52. Gorelick FS, Lerch MM. Do Animal Models of Acute Pancreatitis Reproduce Human Disease? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;4(2):251-262.
53. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977;373(2):97-117.
54. Rahimian R, Zirak MR, Seyedabadi M, et al. Protective effects of tropisetron on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Biomed Pharmacother* 2017;93:589-595.
55. Pfförringer S. Ueber die Selbstverdauung des Pankreas. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 1899;158:126-47.
56. Bartholomew C. Acute scorpion pancreatitis in Trinidad. *Br Med J* 1970;1(5697):666-8.
57. Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2013;144(6):1180-93.
58. Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980;15(4):411-6.
59. Aho HJ, Ahola RA, Tolvanen AM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Changes in pulmonary phospholipids during sodium taurocholate-induced acute pancreatitis. *Res Exp Med (Berl)* 1983;182(1):79-84.
60. Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, et al. Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas* 2008;36(2):e9-21.

61. Venglovecz V RZ, Hegyi P. The effects of bile acids on pancreatic ductal cells. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* [Internet]. 2016 [cited 2019 oct 30]. Available from: <https://pancreapedia.org/reviews/effects-of-bile-acids-on-pancreatic-ductal-cells>.
62. Nakamura K, Fukatsu K, Sasayama A, Yamaji T. An immune-modulating formula comprising whey peptides and fermented milk improves inflammation-related remote organ injuries in diet-induced acute pancreatitis in mice. *Biosci Microbiota Food Health* 2018;37(1):1-8.
63. Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr* 1984;114(3):467-71.
64. Venglovecz V RZ, Hegyi P. The effects of bile acids on pancreatic ductal cells. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* [Internet]. 2016 [cited 2019 oct 30]. Available from: <https://pancreapedia.org/reviews/effects-of-bile-acids-on-pancreatic-ductal-cells>.
65. Bettaieb A, Xi Y, Hosein E, et al. Pancreatic T cell protein-tyrosine phosphatase deficiency ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Commun Signal* 2014;12:13.
66. Okonkwo O, Adeyinka A. *Biochemistry, Cholecystokinin (CCK)* [on line]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2019 [cited 2019 oct 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534204/>.
67. Miller LJ, Desai AJ. Metabolic actions of the type 1 cholecystokinin receptor: its potential as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27(9):609-19.
68. Kim H. Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut Liver* 2008;2(2):74-80.
69. Swell L, Gustafsson J, Danielsson H, Schwartz CC, Halloran LG, Vlahcevic ZR. Bile acid synthesis in humans. *Cancer Res* 1981;41(9 Pt 2):3757-8.

70. Abbing R, Slijepcevic D, Donkers JM, et al. Blocking Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Stimulates Biliary Cholesterol and Phospholipid Secretion in Mice. *Hepatology* 2019.
71. Ceranowicz P, Cieszkowski J, Warzecha Z, Dembinski A. Experimental models of acute pancreatitis. *Postepy Hig Med Dosw* 2015;69:264-9.
72. Feng C, Li B, Wang LL, et al. Effect of peritoneal lavage with ulinastatin on the expression of NF-kappaB and TNF-alpha in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *Exp Ther Med* 2015;10(6):2029-2034.
73. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Algul H, Habtezion A. Autophagy, Inflammation, and Immune Dysfunction in the Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology* 2017;153(5):1212-1226.
74. Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 2005;54(12):522-7.
75. Souza LJ, Mendona Coelho AM, Sampietre SN, Martins JO, Cunha JEM, Cesar Machado MC. Anti-Inflammatory Effects of Peritoneal Lavage in Acute Pancreatitis. *Pancreas* 2010;39(8):1180-1184.
76. Vandamme TF. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci* 2014:2-9.
77. Tao L, Reese TA. Making Mouse Models That Reflect Human Immune Responses. *Trends Immunol* 2017;38(3):181-193.
78. Mariana BS, Márcia KK, Denise FB, Marcel CCM, Heraldo PS. Sodium Taurocholate Induced Severe Acute Pancreatitis in C57BL/6 Mice. *JoVE* 2021(172).
79. van Baal JO, Van de Vijver KK, Nieuwland R, et al. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell* 2017;49(1):95-105.
80. Drack M. Ludwig von Bertalanffy's organismic view on the theory of evolution. *JEZ-B molecular and developmental evolution* 2015.

81. Liebermann-Meffert D. The greater omentum. Anatomy, embryology, and surgical applications. *Surg Clin North Am* 2000;80(1):275-93, xii.
82. Burn SF, Hill RE. Left-right asymmetry in gut development: what happens next? *Bioessays* 2009;31(10):1026-37.
83. Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, Vargas-Barato F, Riveros-Duenas R. The Peritoneum: Beyond the Tissue - A Review. *Frontiers in Physiology* 2018;9:12. (Review) (In English). DOI: 10.3389/fphys.2018.00738.
84. Yung S, Chan TM. Pathophysiological changes to the peritoneal membrane during PD-related peritonitis: the role of mesothelial cells. *Mediators Inflamm* 2012;2012:484167.
85. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002;7(3):171-91.
86. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(1):9-16.
87. Wang ZB, Li M, Li JC. Recent advances in the research of lymphatic stomata. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;293(5):754-61.
88. Bain CC, Jenkins SJ. The biology of serous cavity macrophages. *Cell Immunol* 2018;330:126-135.
89. Ray A, BloodCenter of Wisconsin BRI, Dittel BN, BloodCenter of Wisconsin BRI. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *JoVE* 2010(35).
90. Clarke AJ, Riffelmacher T, Braas D, Cornall RJ, Simon AK. B1a B cells require autophagy for metabolic homeostasis and self-renewal. *Journal of Experimental Medicine* 2018;215(2):399-413.
91. Composto G, Gonzalez D, Bucknum A, et al. Peritoneal T lymphocyte regulation by macrophages. *Immunobiology* 2011;216(1-2):256-64.
92. Kobayashi T, Noguchi T, Saito K, et al. Eosinophilic Inflammation in Peritoneal Fibrosis Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Contrib Nephrol* 2018;196:1-4.

93. McCully ML, Madrenas J. Dendritic cells as arbiters of peritoneal immune responses. *Perit Dial Int* 2006;26(1):8-25.
94. Cassado AA, D'Imperio Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* 2015;6:225.
95. Galvan-Pena S, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 2014;5:420.
96. Cain DW, O'Koren EG, Kan MJ, et al. Identification of a tissue-specific, C/EBPbeta-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 2013;191(9):4665-75.
97. Takenaka E, Van Vo A, Yamashita-Kanemaru Y, Shibuya A, Shibuya K. Selective DNAM-1 expression on small peritoneal macrophages contributes to CD4(+) T cell costimulation. *Sci Rep* 2018;8(1):15180.
98. Gautier EL, Ivanov S, Williams JW, et al. Gata6 regulates aspartoacylase expression in resident peritoneal macrophages and controls their survival. *J Exp Med* 2014;211(8):1525-31.
99. Cassado AA, de Albuquerque JA, Sardinha LR, et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS One* 2011;6(7):e22141.
100. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(6):2568-73.
101. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014;157(4):832-44.
102. Wang RX, Colgan SP. Special pro-resolving mediator (SPM) actions in regulating gastrointestinal inflammation and gut mucosal immune responses. *Mol Aspects Med* 2017;58:93-101.

103. Maseda D, Candando KM, Smith SH, et al. Peritoneal Cavity Regulatory B Cells (B10 Cells) Modulate IFN- γ +CD4+ T Cell Numbers During Colitis Development in Mice. *J Immunol* 2013;191(5):2780-95.
104. Sion MK, Davis KA. Step-up approach for the management of pancreatic necrosis: a review of the literature. *Trauma Surg Acute Care Open* 2019;4(1):e000308.
105. Moggia E, Koti R, Belgaumkar AP, et al. Pharmacological interventions for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;4:Cd011384.
106. Gomatos IP, Halloran CM, Ghaneh P, et al. Outcomes From Minimal Access Retroperitoneal and Open Pancreatic Necrosectomy in 394 Patients With Necrotizing Pancreatitis. *Ann Surg* 2016;263(5):992-1001.
107. Rasch S, Phillip V, Reichel S, et al. Open Surgical versus Minimal Invasive Necrosectomy of the Pancreas-A Retrospective Multicenter Analysis of the German Pancreatitis Study Group. *PLoS One* 2016;11(9):e0163651.
108. Mehrotra R, Devuyst O, Davies SJ, Johnson DW. The Current State of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(11):3238-3252.
109. Francois K, Ronco C, Bargman JM. Peritoneal Dialysis for Chronic Congestive Heart Failure. *Blood Purif* 2015;40(1):45-52.
110. Labato MA. Peritoneal dialysis in emergency and critical care medicine. *Clin Tech Small Anim Pract* 2000;15(3):126-35.
111. Li Q, Zhu B, Zhu X, et al. Treatment of necrotizing acute pancreatitis with peritoneal lavage and dialysis by a new simplified technique insert catheters: One retrospective study. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(23).
112. Lankisch PG, Koop H, Winckler K, Schmidt H. Continuous peritoneal dialysis as treatment of acute experimental pancreatitis in the rat. II. Analysis of its beneficial effect. *Dig Dis Sci* 1979;24(2):117-22.
113. Crabtree JH, Chow KM. Peritoneal Dialysis Catheter Insertion. *Semin Nephrol* 2017;37(1):17-29.

114. Jong N RS, Kim H. Clinical effectiveness of continuous peritoneal lavage in moderately severe to severe acute pancreatitis. *Muller Journal of Medical Sciences and Research* 2019;10(1):21-25.
115. Cooper MJ, Williamson RC, Pollock AV. The role of peritoneal lavage in the prediction and treatment of severe acute pancreatitis. *Ann R Coll Surg Engl* 1982;64(6):422-7.
116. Mayer AD, McMahon MJ, Corfield AP, et al. Controlled clinical trial of peritoneal lavage for the treatment of severe acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1985;312(7):399-404.
117. Ihse I, Evander A, Gustafson I, Holmberg JT. Influence of peritoneal lavage on objective prognostic signs in acute pancreatitis. *Ann Surg* 1986;204(2):122-7.
118. De Waele E, Malbrain M, Spapen HD. How to deal with severe acute pancreatitis in the critically ill. *Curr Opin Crit Care* 2019;25(2):150-156.
119. Li Z, Xia C, Zhang L, Zhang Y, Liu Z, Qiu F. Peritoneal Lavage for Severe Acute Pancreatitis A Meta-analysis and Systematic Review. *Pancreas* 2016;45(6):806-813.
120. He WH, Xion ZJ, Zhu Y, et al. Percutaneous Drainage Versus Peritoneal Lavage for Pancreatic Ascites in Severe Acute Pancreatitis: A Prospective Randomized Trial. *Pancreas* 2019;48(3):343-349.
121. Aziz M, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. *J Immunol* 2017;199(2):750-760.
122. Haro MA, Dyevoich AM, Phipps JP, Haas KM. Activation of B-1 Cells Promotes Tumor Cell Killing in the Peritoneal Cavity. *Cancer Research* 2019;79(1):159-170.
123. Wang J, Kubes P. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* 2016;165(3):668-678.
124. Hyun JJ, Lee HS. Experimental Models of Pancreatitis. *Clin Endosc* 2014;47(3):212-6.

125. de Oliveira Andrade R, Kunitake T, Koike MK, Machado MC, Souza HP. Effects of diazoxide in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Clinics (Sao Paulo)* 2017;72(2):125-129.
126. Griffiths KG, Alworth LC, Harvey SB, Michalski ML. Using an intravenous catheter to carry out abdominal lavage in the gerbil. *Lab Animal* 2010;39(5):143-148. (Special Features) (In En). DOI: doi:10.1038/lab0510-143.
127. Nikitidou O, Peppas VI, Leivaditis K, Eleftheriadis T, Zarogiannis SG, Liakopoulos V. Animal models in peritoneal dialysis. *Front Physiol* 2015;6 (In eng). DOI: 10.3389/fphys.2015.00244.
128. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp* 2010(35)
129. Nelson DS, North RJ. The fate of peritoneal macrophages after the injection of antigen into guinea pigs with delayed-type hypersensitivity. *Lab Invest* 1965;14:89-101.
130. Sonozaki H, Cohen S. The macrophage disappearance reaction: mediation by a soluble lymphocyte-derived factor. *Cell Immunol* 1971;2(4):341-52.
131. Barth MW, Hendrzak JA, Melnicoff MJ, Morahan PS. Review of the macrophage disappearance reaction. *J Leukoc Biol* 1995;57(3):361-7.
132. Okabe Y, Medzhitov R. Wormhole Travel for Macrophages. *Cell* 2016;165(3):518-9.
133. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol* 2011;41(8):2155-64.
134. Saeki K, Kanai T, Nakano M, et al. CCL2-induced migration and SOCS3-mediated activation of macrophages are involved in cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2012;142(4):1010-1020.e9.

135. Glauco Frazão Flexa Ribeiro GHdS, Maylla Luanna Barbosa Martins, Eduarda Gomes Boguea, Joycilene Garces Cantanhede, Joana D'arc Matos França de Abreu. Etiologia e mortalidade por pancreatite aguda: uma revisão sistemática. *Arquivos Catarinenses de Medicina* 2017;46(4).
136. Xu L, Yang F, Lin R, Han C, Liu J, Ding Z. Induction of m2 polarization in primary culture liver macrophages from rats with acute pancreatitis. *PLoS One* 2014;9(9):e108014. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0108014.
137. Dang SC, Wang H, Zhang JX, et al. Are gastric mucosal macrophages responsible for gastric injury in acute pancreatitis? *World J Gastroenterol* 2015;21(9):2651-7.
138. Gea-Sorli S, Closa D. In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. *BMC Immunol* 2009;10:42. (In eng). DOI: 10.1186/1471-2172-10-42.
139. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, et al. Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas* 2003;27(3):253-60.
140. Kawaguchi S, Aibiki M, Ogura S, et al. Cytokine changes in plasma and peritoneal lavage fluid in patients with severe acute pancreatitis. *Shock* 1999;11:40-40.
141. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, et al. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery* 2002;132(1):86-92. DOI: 10.1067/msy.2002.125171.
142. Liu RH, Wen Y, Sun HY, et al. Abdominal paracentesis drainage ameliorates severe acute pancreatitis in rats by regulating the polarization of peritoneal macrophages. *World J Gastroenterol* 2018;24(45):5131-5143.