

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

MESTRADO INTERINSTITUCIONAL:

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**Efeito da oxigenioterapia hiperbárica sobre as lesões
teciduais na pancreatite aguda em um modelo
experimental em ratos.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCIO FESTUGATO

ORIENTADOR:
PROF. DR. LUIZ ROHDE.

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

F418e Festugato, Marcio
Efeito da oxigenioterapia hiperbárica sobre as lesões teciduais na
pancreatite aguda em um modelo experimental em ratos / Marcio
Festugato. 2006.

50 f. : il. ; 30 cm.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Rohde.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Sul; Universidade de Caxias do Sul, Programa Interinstitucional de
Pós-Graduação em Cirurgia, 2006.

1. Pancreatite aguda. 2. Pâncreas – Inflamação aguda – Tratamento.
3. Oxigenoterapia hiperbárica. I. Rohde, Luiz. II. Título.

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|---|-----------------|
| 1. Pancreatite aguda | 616.37-002.1 |
| 2. Pâncreas – Inflamação aguda – Tratamento | 616.37-002.1-08 |
| 3. Oxigenoterapia hiperbárica | 615.835 |

- a. Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
2- Márcia Carvalho Rodrigues – CRB 10/1411

A Deus, agradeço pela vida e por todas as oportunidades de aprender, errar, corrigir e evoluir.

A Jesus, agradeço por ter vindo nos trazer as bases para uma fé racional e libertadora.

A minha esposa **Rosa** e minhas filhas **Taisa** e **Liciane**, agradeço pela paciência, incentivo, ânimo, consolo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e execução desta dissertação e, em especial:

Ao Professor Dr. Luiz Rohde, mestre exemplar e modelo a ser seguido por todos aqueles que amam a ciência e o desejo de ser útil aos que sofrem. Agradeço por ter sido escolhido como pupilo, pelas suas orientações que reativaram a paixão de ser médico, professor e pesquisador.

Ao Professor Dr. Celso Picolli Coelho, por ter encontrado tempo e ter tido paciência de examinar todas as lâminas das peças operatórias desta pesquisa.

Aos acadêmicos Gustavo Fiedler, Felipe Pioner Machado, Mauro Cabral Gongalves, Filipe Rech Bassani e Paulo Henrique Pierezan pelo empenho, dedicação, estudo, confraternização e fundamental auxílio em todas as tarefas desta pesquisa.

Ao professor Dr. Wilson P. Spiandorello, amigo querido que ama o seu trabalho, perdendo horas nos estimulando e nos ajudando a resolver os problemas que surgem.

À Andréa Pavan, jovem secretária responsável pelo Laboratório de Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade de Caxias do Sul, dedicada e afetuosa com os nossos pequenos animais de estudo, que nos ensinou a amá-los e respeitá-los.

A Janus & Pergher pela doação de uma Câmara Hiperbárica para o estudo experimental (empresa fabricante de Câmaras Hiperbáricas no Brasil).

RELAÇÃO DOS MEMBROS COMPONENTES DA PESQUISA

Professor Dr. Celso Picolli Coelho

Professor de patologia do Departamento de Ciências Biomédicas da
Universidade de Caxias do Sul;

Doutor em Medicina pela Universidade de Duseldorf.

Gustavo Fiedler

Felipe Pioner Machado

Mauro Cabral Gonçalves

Filipe Rech Bassani

Paulo Henrique Pierezan

Acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade de Caxias do Sul.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE GRÁFICOS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	X - XI
LISTA DE SÍMBOLOS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
População de Estudo.....	10
Alocação em Grupos.....	11
Indução da Pancreatite Aguda.....	12
Sessão de OHB.....	13
Eutanásia dos animais.....	14
Análise Histológica.....	14
Análise Estatística.....	16
Ética.....	17
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	33
PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Divisão dos grupos.....	11
Tabela 2	Critério Numeral de Escores Histopatológicos.....	16
Tabela 3	Média dos escores histopatológicos no 1º dia	26
Tabela 4	Média dos escores histopatológicos no 3º dia.....	26
Tabela 5	Média dos escores histopatológicos no 7º dia.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ambiente de acomodação dos ratos.....	10
Figura 2	Representação esquemática do grupo controle na linha de tempo.....	11
Figura 3	Representação esquemática do grupo OHB na linha de tempo.....	11
Figura 4	Modelo da LCP.....	12
Figura 5	Ligadura dos canais pancreático e biliar.....	13
Figura 6	Câmara hiperbárica para animais de pequeno porte.....	14
Figura 7	Macroscopia do 1º dia do grupo controle.....	19
Figura 8	Macroscopia do 1º dia do grupo OHB.....	20
Figura 9	Macroscopia 3º dia do grupo controle.....	20
Figura 10	Macroscopia 3º dia do grupo OHB.....	21
Figura 11	Macroscopia 7º dia do grupo controle.....	21
Figura 12	Macroscopia 7º dia do grupo OHB.....	22
Figura 13	Caso de PA severa.....	22
Figura 14	Pâncreas normal (400X).....	23
Figura 15	Edema e infiltração leucocitária (100X).....	23
Figura 16	Edema e infiltração leucocitária (400X).....	24
Figura 17	Foco de hemorragia (100X).....	24
Figura 18	Foco de necrose acinar e esteatonecrose (100X).....	25
Figura 19	Foco de necrose acinar (400X).....	25
Figura 20	Edema com ectasia do ducto pancreático (100X).....	26

LISTA DOS GRÁFICOS

Gráfico 1	Média do Edema.....	27
Gráfico 2	Média da Hemorragia.....	28
Gráfico 3	Média da Infiltração Leucocitária.....	28
Gráfico 4	Média da Necrose Acinar.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

PA: Pancreatite Aguda

RLO: Radicais livres de oxigênio

ON: Óxido nítrico

FNKB: fator nuclear Kappa- β

IL-6: interleucina-6

FNT- α : fator de necrose tumoral- α

ICAM-1: adesão de moléculas intercelular-1

PMN: polimorfonucleares

IL: interleucinas

FAP: fator ativador plaquetário

MDA: malonilaldeído

GSH: glutationa

GP-X: glutationa peroxidase

SOD: superóxido desmutase

ATP: adenosina-tri-fosfato

SRA: sistema renina-angiotensina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PaO₂: pressão sangüínea de oxigênio arterial

HIF-1 α : fator-1 α hipóxia induzível

OHB: oxigenioterapia hiperbárica

O₂: oxigênio

ATA: atmosfera absoluta

LCP: ligadura do canal pancreático

UFPEL: Universidade Federal Pelotas

CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

UCS: Universidade de Caxias do Sul

SC: subcutâneo

HE: hematoxilina-eosina

CAR: campo de alta resolução

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcento

α : alfa

β : beta

h: horas

g: gramas

cm: centímetro

ml: mililitro

mg: miligrama

°C: graus centígrados

μ : micras

l: litro

UI: unidade internacional

RESUMO

Introdução: a pancreatite aguda é uma doença que se apresenta na forma grave em 20 a 30% dos casos devido a complicações locais ou sistêmicas. A ativação de citocinas, produção de radicais livres de oxigênio, insuficiência da macro e da microcirculação, levando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sépsis e falência de múltiplos órgãos resultam na mortalidade acima de 20% nas pancreatites complicadas. A oxigenioterapia hiperbárica (OHB) devido aos efeitos antiinflamatórios, da melhora da perfusão tecidual, do aumento da atividade antibacteriana dos leucócitos, do aumento da produção de antioxidantes, da ação bactericida e bacteriostática, do aumento na proliferação celular e síntese de colágeno na cicatrização das feridas, tem sido proposta para o tratamento da pancreatite aguda. **Objetivo:** estudar os efeitos da OHB nas lesões teciduais: edema; infiltração leucocitária; focos hemorrágicos e necrose acinar, em um modelo experimental de pancreatite aguda (PA) induzida pela ligadura do canal biliar-pancreático (LCP). **Material e Método:** quarenta e oito ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), foram divididos em grupo controle e grupo tratado com OHB. Ambos foram divididos em 3 subgrupos de 8 ratos cada para serem sacrificados nos dias 1, 3 e 7 após a indução da PA. Os animais do grupo tratado, 6 horas após a LCP começaram a receber uma sessão diária de OHB, com duração de 2 horas a 2,5 ATA.. O pâncreas foi submetido a estudo histopatológico, avaliando-se a intensidade do edema, da infiltração leucocitária, da hemorragia e da necrose acinar. **Resultados:** a análise estatística das médias demonstra que a OHB foi eficiente em reduzir com significância a necrose acinar no primeiro dia ($p=0.03$) e os focos de hemorragia no sétimo dia ($p=0,05$). O edema e a infiltração leucocitária não sofreram a redução esperada. **Conclusão:** neste modelo de PA induzida pela LCP, a utilização de uma sessão diária de OHB a 2,5 ATA, é eficiente para reduzir a necrose acinar, mas não é suficiente para reduzir o edema e a infiltração leucocitária. São necessários novos estudos para estabelecer o número de sessões diárias e os níveis de pressão em ATA que sejam eficientes para tratar a pancreatite aguda.

ABSTRACT

Introduction: acute pancreatitis is an illness that presents itself as severe in 20 to 30% of the cases due to local or systemic complications. The activation of cytokines, production of oxygen free radicals, insufficiency of macro and microcirculation, leading to systemic inflammatory response syndrome, sepsis and collapse of multiple organs, result in mortality over 20% in complicated pancreatitis. Hyperbaric oxygen therapy (HBO) has been proposed for the treatment of acute pancreatitis due to the anti-inflammatory effects, improvement of tissue perfusion, increase of the anti-bacterian activity of the leukocytes, increase the production of antioxidants, bactericide and bacteriostatic action, increase the cellular proliferation and collagen synthesis in the healing of the wounds. **Objective:** to study the effects of HBO on tissue lesions: edema; leukocyte infiltration; hemorrhagic foci and acinar necrosis, in an experimental model of acute pancreatitis (AP) induced by bile-pancreatic duct ligation (PDL). **Material and Methods:** forty-eight Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were divided into a control group (Group I) and a group treated with HBO (Group II). Both were divided into 3 sub-groups of 8 rats each to be sacrificed on days 1, 3, and 7 after the AP induction. The animals of the group II started to receive, 6 hours after the PDL, a two-hour daily session of HBO at 2.5 ATA. The histopathologic evaluation was done according the following criteria: edema, leukocyte infiltration, hemorrhage and acinar necrosis. The means of these findings were made and the groups were compared using the Mann-Whitney U test. **Results:** the statistical analysis of the means demonstrates that the HBO was efficient in reducing significantly the acinar necrosis on the first day ($p=0.03$) and the foci of hemorrhage on the seventh day ($p=0.05$). The edema and leukocyte infiltration did not suffer the reduction expected. **Conclusion:** in this AP model induced by PDL, the utilization of a daily session of HBO at 2.5 ATA is efficient to reduce the acinar necrosis but is not sufficient to reduce the edema and the leukocyte infiltration. New studies are necessary to establish the number of daily sessions and the pressure levels in ATA that are efficient to treat acute pancreatitis.

INTRODUÇÃO

Desde 1992, no Simpósio de Atlanta, a pancreatite aguda (PA) foi definida como sendo um processo inflamatório agudo do pâncreas com envolvimento variável dos tecidos peripancreáticos e/ou sistemas orgânicos a distância¹. Nos EUA ocorrem cerca de 250.000 casos de PA a cada ano, resultando em mais de 4000 mortes. A incidência está em torno de 38 casos por 100.000 pessoas por ano².

A PA pode ser atribuída a cálculos biliares e ao álcool em 80% dos casos. Em 10% surgem como fatores causais o uso de medicamentos, os traumas, a isquemia, a hipertrigliceridemia, a hipercalcemia, os fatores genéticos e as infecções³. Nos 10% restantes considerados de causa idiopática, na realidade encontra-se a microlitíase como fator causal em dois terços a três quartos dos casos⁴.

Apresenta-se clinicamente com um quadro de dor abdominal intensa, vômitos, distensão abdominal acompanhada de defesa a palpação do abdome e sem grandes manifestações sistêmicas, nos casos leves. Nos casos graves se apresenta com ventre em tabua e com complicações como choque, hipotensão, síndrome da angustia respiratória do adulto, insuficiência renal aguda, insuficiência hepática e até a morte²⁻⁵. Portanto, apresenta um quadro clínico que varia desde uma situação leve e autolimitada a uma enfermidade fulminante que resulta em morte devido à falência de múltiplos órgãos, com índices de mortalidade de 50 a 60% na primeira semana⁶.

Laboratorialmente se caracteriza pela presença da elevação dos níveis de amilase e lipase no sangue e/ou na urina⁵. Os níveis dessas enzimas não são específicos para indicar a gravidade da doença, apenas confirmam o diagnóstico.

O desenvolvimento da PA foi atribuído à ativação de enzimas digestivas nas células acinares, resultando na autodigestão do pâncreas⁷. Todas as causas de PA passam por esse tipo de padrão em que ocorre uma elevação do cálcio intracelular, desidratação celular e bloqueio na secreção, resultando na ativação do tripsinogênio dentro da célula acinar^{4, 8}. A tripsina passa a ativar outras enzimas e proteases intracelulares, seguido pela geração e liberação de mediadores inflamatórios.

A patogenia desse processo inflamatório pode resultar na forma leve da doença com inflamação e edema local ou até a forma severa com necrose do

pâncreas e tecidos peripancreáticos devido à ação digestiva das enzimas pancreáticas ativadas e dos mediadores inflamatórios, liberando substâncias tóxicas na circulação e no espaço peritoneal, levando a manifestações sistêmicas e falência de múltiplos órgãos^{4,8,9}. Este quadro sugere um intrincado balanço entre o dano tecidual localizado com a produção de citocinas pró-inflamatórias e a resposta antiinflamatória sistêmica que restringe o movimento inapropriado de agentes pró-inflamatórios na circulação¹⁸.

Esse processo inflamatório pode permanecer estéril ou sofrer contaminação pela translocação de bactérias ou fungos existentes na luz intestinal e se transformar em necrose infectada¹⁹⁻²⁰.

Não há ainda uma terapia específica para a PA. Assim as taxas de morbidade e mortalidade continuam elevadas nos casos graves e decorrem da falência de múltiplos órgãos que pode ocorrer no início da crise ou tardiamente⁵⁶. Os tratamentos visam dar suporte às funções orgânicas e prevenir complicações, com ênfase a manutenção da oxigenação tecidual, nutrição e controle da infecção⁵⁷.

REVISÃO DA LITERATURA

Todos os casos de PA começam com a ativação do tripsinogênio em tripsina dentro dos grânulos de zimogênio, seguindo-se uma cascata de ativação das demais enzimas, proteases, citocinas, radicais livres de oxigênio e moléculas vasoativas^{3,8}.

Essas substâncias são as responsáveis pela alteração na permeabilidade vascular, resultando na formação do edema e isquemia do pâncreas e de outros órgãos como o estômago, o intestino delgado, os cólons, baço, fígado, rins, pulmões e coração, alterando as funções hepáticas, comprometendo a função renal, retardando a motilidade intestinal e de recrutarem outras células^{8,9}.

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas que chegam aos tecidos pancreáticos lesados e se tornam os principais secretores de citocinas, radicais livres do oxigênio (RLO) e moléculas vasoativas como o óxido nítrico (ON), produzindo uma cascata de eventos patológicos locais e sistêmicos³⁻¹⁰. Os RLO (superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidróxido e o malondialdeído) produzidos pelos neutrófilos ativam o fator nuclear Kappa- β (FNKB) resultando na produção de citocinas inflamatórias nas células acinares, principalmente a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (FNT- α)^{11,12,13,14,15}. Nas primeiras 2 horas há uma intensa produção de RLO pelas células acinares, elevação na expressão da adesão de moléculas intercelular-1 (ICAM-1) com pouca aderência de polimorfonucleares (PMN) nos endotélios. A partir da oitava hora persistem a elevações do ICAM-1 e difusa aderência leucocitária sendo eles os principais produtores dos RLO^{16,17}.

Participam nesta interação substâncias pró-inflamatórias que são as interleucinas (IL), IL-1 β , IL-6 e IL-8; (FNT- α) e o fator ativador plaquetário (FAP), que são mediadores prejudiciais centrais, responsáveis por muitas das manifestações locais, sistêmicas e pela transformação de um processo localizado em uma doença que afeta múltiplos órgãos, além de estimular a produção dos demais mediadores^{2,4}.

As substâncias antiinflamatórias são a IL-10, o receptor solúvel do FNT e o antagonista do receptor da IL-1. Há outros compostos implicados na patogênese da

PA que incluem o complemento, a bradicinina, ON, RLO a substância P e altas poliaminas¹⁷. A IL-10 e o ON são agentes que protegem dessas injúrias microvasculares associadas a PA²¹. Os leucócitos PMN são os principais produtores de RLO^{22,23}. Em humanos, os casos de PA severa apresentam baixos níveis de IL-10, enquanto que na PA leve esses níveis são altos no primeiro dia²⁴.

A produção do FAP é essencial para a síntese de leucotrieno B4 como parte do mecanismo que promove a acumulação dos leucócitos²⁵. Estudos experimentais em animais mostram que os níveis de FNT e a IL-6 aumentam nas primeiras 3 horas do início da PA e após retornam para os níveis normais. A ação do FNT indica que ele induz a morte das células pancreáticas por apoptose²⁶. A IL-6 endógena exerce atividade antiinflamatória durante a PA, porque regula a ICAM-1, com a subsequente adesão e ativação dos neutrófilos e a geração de citocinas e RLO²⁷. As alterações na microcirculação são diretamente proporcionais ao aumento na expressão do ICAM-1 e os neutralizadores de RLO reduzem a expressão do ICAM-1, melhorando a microcirculação pancreática por reduzir a adesão leucocitária no endotélio²⁸⁻²⁹.

O estresse oxidativo está bem documentado no tecido pancreático, com a geração e acumulação dos RLO mediados pela peroxidação lipídica com concomitante depleção dos antioxidantes³⁰. As concentrações tissulares de malonilaldeído (MDA) aumentam nas primeiras 24 h, enquanto que os níveis de glutathiona (GSH), glutathiona peroxidase (GP-x), catalase, superóxido desmutase (SOD) estão todas significativamente diminuídas em relação aos controles^{31,32}. Além disso o pâncreas não tem capacidade de se defender do estresse oxidativo, ao contrário do fígado e dos rins³³. Estudos de imunistoquímica demonstram a presença de SOD mais intensamente nas células ductais, células das ilhotas e células centro-acinares, enquanto que estão ausentes nas células acinares³⁴.

Sanchez-Bernal, em estudo publicado em 2004, demonstrou que ratos com PA apresentam elevações significativas dos níveis séricos das seguintes substâncias que participam das reações do stress oxidativo: superóxido, hidróxido de hidrogênio e malondialdeído; proteínas do grupo carbonil; SOD e catalases. Este estudo sugere que os microssomos, seguidos pelos lisossomos e as mitocôndrias são as organelas celulares mais suscetíveis a danos pelas enzimas oxidativas e que o óxido nítrico endógeno participa como elemento protetor contra esses danos^{13,35}.

Os principais produtos formados pela hipo-oxigenação dos tecidos são produzidos pela degradação do adenosina-tri-fosfato (ATP) em hipoxantina. A supressão do transporte do íon através das membranas celulares conduz ao aumento do cálcio no citosol, que ativa proteases, tais como a fosfocinase, promovendo a conversão excessiva e prejudicial da xantina-desidrogenase em xantina-oxidase. Após a reperfusão do tecido isquêmico, as concentrações elevadas da xantina-oxidase usarão o oxigênio entrante para produzir o hidroperóxido e liberar grandes quantidades de radicais livres agressivos^{13,14}. A dissociação da água oxigenada por íons metálicos tais como o ferro e o cobre, estimula a produção de hidroxilas do radical livre que é altamente prejudicial ao tecido reperfundido causando a ruptura de estruturas celulares e sub-celulares³⁶. Figura 1. Os RLO lesam a membrana plasmática e as mitocôndrias das células acinares, reduzindo a produção de ATP³⁷.

Folch e colaboradores, num estudo experimental de PA em ratos, concluíram que os RLO gerados pelo metabolismo da xantina e xantina-oxidase, quando liberados na corrente circulatória estão envolvidos na falência de múltiplos órgãos³⁸.

Araki e colaboradores estudando o efeito de um neutralizador de RLO em um modelo experimental de PA por obstrução duodenal em alça fechada, concluíram que os RLO participam na patogênese da PA e que os neutralizadores de RLO têm um efeito citoprotetor sobre as células acinares³⁹.

Alsfasser e colaboradores, estudando os efeitos da inibição na secreção de glutathione, eliminador de RLO, em um modelo experimental de PA em ratos, observaram que a falta deste anti-radical está acompanhada de uma menor sobrevivência e aumento da necrose e que isto é devido mais aos efeitos sistêmicos dos RLO do que aos efeitos locais⁴⁰.

Segundo Keck e colaboradores a aderência dos leucócitos no endotélio vascular é reduzida pela ação de dimetilsulfoxida que é um limpador de RLO, melhorando a perfusão tecidual através da normalização da velocidade de passagem das hemácias pelos capilares, sugerindo que os RLO participam nos distúrbios da microcirculação na PA²⁹. Segundo Cuthbertson e colaboradores a vasoconstrição, os desvios arterio-venosos, a perfusão inadequada, o aumento da viscosidade sangüínea e da coagulação são distúrbios que bloqueiam a microcirculação e causam o desenvolvimento da doença necrotizante severa^{41,42}.

Gomes e colaboradores demonstraram que durante a PA, múltiplos genes responsáveis pela apoptose e reposição de células acinares são agudamente ativados e a apoptose dessas células é promovida pela privação de oxigênio, isto é, a hipóxia, através da ativação do fator-1 α hipóxia induzível (HIF-1 α)⁴⁸. Shi e colaboradores, fazendo uma revisão sistemática na literatura sobre os efeitos dos RLO na PA experimental, observaram que os RLO estão diretamente comprometidos no dano celular e regulam sinais intercelulares na falência de múltiplos órgãos, através da ativação dos PMN, produção de citocinas, disfunção da barreira endotelial e disfunções na microcirculação. A ativação do fator de transcrição nuclear Kappa β (FTNKB) ativa citocinas inflamatórias que promovem a sinalização intercelular responsável pela insuficiência de órgãos a distância^{49,50}.

Yasar e colaboradores estudaram os efeitos da oxigenioterapia hiperbárica (OHB) em um modelo experimental de PA em ratos e constataram que a OHB tem um efeito benéfico na PA e esse efeito ocorre pela produção de antioxidantes⁵¹. Isik e colaboradores constataram que a OHB reduz os parâmetros do estresse oxidativo, os níveis de amilase e os escores histopatológicos em um estudo experimental de PA necrotizante em ratos⁵². Cuthbertson e colaboradores constataram que a OHB atua como um agente antiinflamatório e antimicrobiano além de melhorar a microcirculação local e sistêmica⁴¹.

A OHB é uma terapia que age ofertando às células em sofrimento aquilo que elas mais necessitam, o oxigênio (O₂). Isto é possível porque a respiração de O₂ em um ambiente com pressão atmosférica acima de 1 atmosfera absoluta (ATA) promove a diluição desse gás no plasma. Quanto maior a pressão do ambiente onde o indivíduo se encontra respirando O₂ a 100%, maior a concentração de O₂ diluído no plasma, tanto é que sob uma pressão de 3 ATA é possível manter um paciente vivo só com o teor de O₂ diluído no plasma, porque atinge valores de até 6,8 volumes %^{53,54,55}.

Esta oferta de O₂ também satura as hemácias em 100% e este somatório gera a hiperóxia circulatória e tecidual que tem os seguintes efeitos no organismo doente: a) redução do edema pelo efeito vasoconstritor e eliminação da hipóxia tecidual decorrentes do edema e da isquemia; b) prevenção e combate a infecções por ofertar aos leucócitos os teores teciduais de O₂ necessários para que eles exerçam a sua atividade oxidativa, além de criar um meio inóspito para os

microorganismos; c) favorecimento da angiogênese por aumentar a deposição de colágeno e a produção do fator de crescimento endotelial vascular por parte dos fibroblastos ativos; d) aumento da produção de antioxidantes; e) redução da aderência dos leucócitos no endotélio vascular melhorando a microcirculação e f) potencialização da ação de vários medicamentos^{53,54,55}.

Vários modelos de experimentais de PA foram desenvolvidos, destacando-se os seguintes: administração retrógrada no canal pancreático de agentes indutores, como sais biliares, enzimas e bactérias; aplicação intraperitoneal de arginina e lisina; hiperestimulação pancreática por administração de ceruleína intravenosa ou colecistoquinina; isquemia pancreática; ligadura do canal pancreático (LCP); dieta deficiente em colina e suplementada com etionina e a técnica da alça duodenal fechada⁵⁸.

O modelo de PA pela administração retrógrada no ducto pancreático de agentes indutores como sais biliares, provoca PA necro-hemorrágica, onde as lesões tipo edema intersticial, extensas necroses e hemorragias são imediatas durante as primeiras 24h. A mortalidade aumenta conforme a quantidade de sais biliares injetados e os animais que sobrevivem após 72h ficam com fibrose e atrofia pancreática⁵⁹.

A PA experimental desenvolvida pela injeção de ceruleína endovenosa, intraperitoneal ou subcutânea, se processa por efeito de hiperestimulação à secreção pancreática, produzindo edema e necrose acinar dose dependente a partir de 6 horas da aplicação, atinge o máximo de lesão em 12 horas e inicia a regressão no quarto dia evoluindo para atrofia e fibrose⁶⁰.

O processo de produção de isquemia pancreática pode ser conseguido de diferentes formas: ligadura da irrigação arterial do pâncreas (tronco celíaco, artéria mesentérica superior, artéria gastroduodenal), ligadura da drenagem venosa do pâncreas (veias esplênica, gástricas curtas e gastroepiplóica esquerda), injeção de microesferas e choque hemorrágico. Produzem PA do tipo edematosa até necro-hemorrágica com esteatonecrose^{14,61}.

A dieta deficiente em colina, suplementada com etionina por 3 a 5 semanas é um modelo experimental que desenvolve PA edematosa e até necro-hemorrágica⁶².

Coelle teve 55% de mortalidade no grupo controle, tornando um modelo inadequado para estudos que requerem sobrevida longa dos animais⁶³.

A PA induzida pela técnica da alça duodenal fechada se baseia no aumento da pressão intraduodenal produzindo refluxo do conteúdo para dentro do ducto pancreático, desencadeando a forma edematosa em 6 horas e a necro-hemorrágica em 12 horas, com focos de esteatonecrose intra-abdominal e ascite^{64,65}.

Para se estudar o efeito de um novo fármaco, necessita-se que o modelo experimental mimetize uma das causas de PA, que produza lesões histológicas semelhantes as que ocorrem nos seres humanos e que os animais não tenham uma sobrevida curta⁶⁶.

A ligadura do canal pancreático junto ao duodeno é um modelo experimental que desenvolve um processo de PA de modo similar ao que acontece na PA biliar em humanos, embora, não seja do tipo severa, permite que o animal permaneça vivo por mais de 14 dias e tem índices de mortalidade quase zero⁶⁶. Além disso, é de fácil execução e pode ser aplicado em animais de experimentação de qualquer peso, enquanto que outros métodos, como a injeção de L-arginina intraperitoneal, se aplicado em ratos com mais de 200g tem alta mortalidade^{67,68}.

Embora existam trabalhos que avaliam o efeito da OHB na PA experimental referidos na literatura internacional, sobre o assunto nada foi encontrado na literatura nacional. Também não existem trabalhos que estudaram a OHB em modelos que usaram para indução da PA a ligadura do ducto pancreático junto ao duodeno e da via biliar antes de chegar ao pâncreas.

OBJETIVO

Estudar os efeitos da OHB sobre a inflamação, o edema, a hemorragia e a necrose na PA induzida em ratos em modelo com a ligadura do canal pancreático e da via biliar.

MATERIAL E MÉTODO

Delineamento

Estudo experimental

População de estudo

Foram utilizados 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas, adultas, pesando entre 200 e 280 g, provenientes do biotério do Instituto de Bociências da Universidade Federal Pelotas (UFPEL). Os animais ficaram albergados no laboratório de fisiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade de Caxias do Sul (UCS) e mantidos em caixas de polipropileno com tampas de arame gradeadas e com dimensões de 35 cm x 50 cm x 20 cm (Figura 2). O fundo das caixas foi coberto com serragem esterilizada em autoclave e trocada três vezes por semana. Os animais receberam ração labina (Purina^Σ) e água *ad libitum* e foram mantidos em ciclo circadiano de 12 horas em ambiente climatizado (Figura 2). Estas especificações técnicas de cuidados com os animais seguiram as normas do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals⁶⁹.



Figura 1. Ambiente de acomodação dos ratos (a) e gaiola com ração e água (b).

Os procedimentos experimentais foram feitos no laboratório de fisiologia do CCBS da UCS. A análise histopatológica foi feita pela disciplina de Patologia do CCBS da UCS.

Alocação em grupos

Os animais foram divididos em dois grupos (24 ratas em cada) por sorteio.

Grupo I – denominado de grupo controle.

Grupo II – denominado grupo tratado com OHB.

Cada um desses grupos foram subdivididos em 3 grupos (A, B e C) de 8 ratos cada, que foram operados e sacrificados no primeiro, terceiro e sétimo dia após a indução da PA (Tabela 1) (Figura 3 e 4).

Tabela 1. Divisão dos grupos

Grupo	1d (A)	3d (B)	7d (C)
Controle	8 ratos	8 ratos	8 ratos
OHB	8 ratos	8 ratos	8 ratos

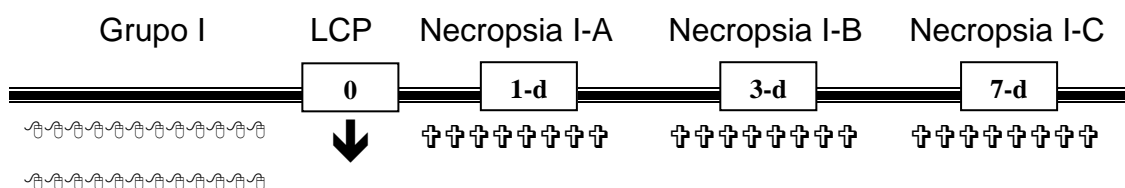


Figura 2. Representação esquemática do grupo controle na linha de tempo.

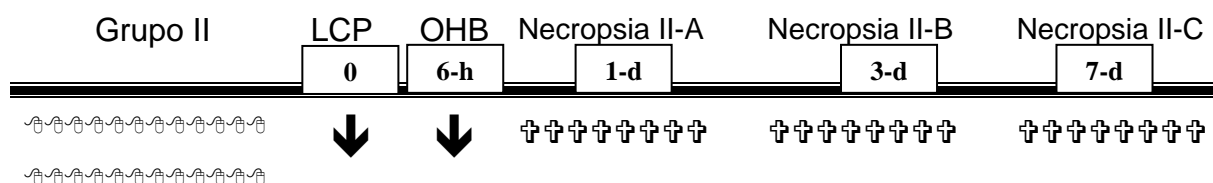


Figura 3. Representação esquemática do grupo OHB na linha de tempo.

Indução da pancreatite aguda

O modelo utilizado para o desenvolvimento da pancreatite aguda provocada pela ligadura do canal pancreático em ratos foi baseado no estudo publicado por Samuel⁷⁰ (Figura 5).

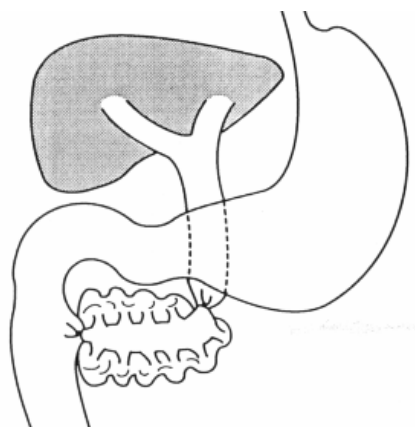


Figura 4. Modelo da LCP

Fonte: Modificado de Samuel I, Toriumi Y, Yokoo H, et al. Ligation-induced acute pancreatitis in rats and opossumus: a comparative morphologic study of the early phase. *J Surg Res.*, 1994; 57: 299-311.

Todos os animais, após jejum de 6 horas, foram anestesiados: sedação com halotano (Fluotane[®], Astra-Zeneca, UK Limited, registro no Ministério da Saúde nº. 1,1618.0014) em campânula, seguido da aplicação no subcutâneo (SC) de 0,1 ml de cloridrato de tiletamina 125mg e cloridrato de zolepam 125mg (Zolitec[®] 50, Virbac, licenciado no Ministério da Agricultura sob nº. 5856 de 31/01/97) e 0,05 ml de morfina no SC para analgesia. Depois de posicionados em decúbito dorsal fixo na mesa de trabalho foi feita a tricotomia, assepsia do campo operatório com álcool iodado e colocação de campos estéreis. O procedimento cirúrgico iniciou com uma laparotomia mediana de 2,0 a 3,0 cm, identificação da alça duodenal que foi exteriorizada para fora da cavidade abdominal permitindo a visualização da via bilio-pancreática. A junção desse canal com o duodeno foi identificada e ligada através da passagem de um fio monofilamentar agulhado de polipropileno 5-0 (Premilene[®] Braun Medical AS, Registro MS nº 100853067) e uma outra ligadura foi feita nesse canal antes dele chegar junto ao canal pancreático, 1,0 a 1,5cm abaixo do hilo hepático (Figura 6). As vísceras foram recolocadas na cavidade abdominal e a mesma foi fechada em 2 planos: primeiro o plano mio-aponeurótico-peritonal e após a pele com esse mesmo fio em sutura contínua.

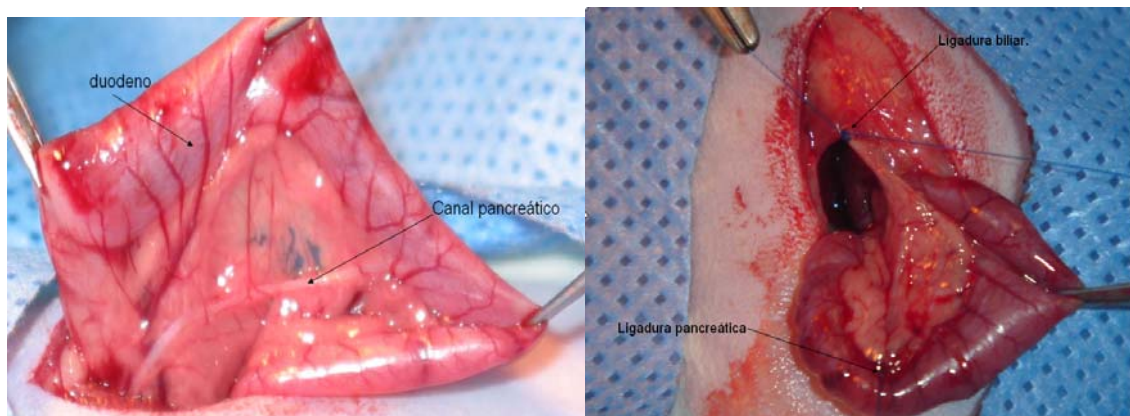


Figura 5. Ligadura dos canais pancreático e biliar.

A antibioticoprofilaxia foi feita na indução anestésica com Ampicilina sódica na dose única de 100mg/kg aplicado no SC. Para esse período de recuperação anestésica a hidratação foi feita pela aplicação no SC de solução fisiológica 0,9% no volume de 10% do peso do animal. Os ratos foram recolocados nas suas caixas em grupos de 4 animais por caixa numeradas, onde tiveram livre acesso à água e alimentação.

Sessão de OHB

Os animais do grupo II, denominado grupo tratado com OHB, 6 horas após o LCP foram colocados em duplas em caixas de polipropileno com tampas de arame gradeadas e com dimensões de 15cm x 15cm x 20cm, capazes de entrar na câmara hiperbárica (Figura 7). Ali foram pressurizados com O₂ a 100% até 2,5 ATA e mantidos durante 120 minutos, ao que se denominou de sessão de OHB. Essas sessões de OHB se repetiram uma vez ao dia até o momento estipulado para serem necropsiados.

Durante esse período, todos os animais, tanto os do grupo I, como os do grupo II, foram mantidos vivos nas suas caixas, onde permaneceram em ambiente climatizado, com livre acesso a água e com alimentação programada.



Figura 6. Câmara hiperbárica para animais de pequeno porte.

Eutanásia dos animais

Nos 1º, 3º e 7º dia pós-operatório, 8 ratos de cada grupo foram novamente anestesiados e submetidos à eutanásia através da intoxicação com halotano. Após a abertura da cavidade abdominal e torácica foi feito um inventário geral das cavidades, as lesões macroscópicas encontradas foram fotografadas. Dos ratos sacrificados no 1º dia pós-operatório foi coletado 3,0 ml de sangue por punção direta no coração para a dosagem de amilase. A peça de estudo composta pelo pâncreas, duodeno e parte do estômago foi colocada em frascos para ser fixada em formalina tamponada a 10%.

O pulmão e o fígado foram coletados e armazenados em meio próprio para futuro estudo.

Análise Histológica

Para o estudo histopatológico o pâncreas foi dissecado da peça, dividido ao meio no seu eixo longitudinal e após, separado em 3 cortes transversais simulando cabeça, corpo e cauda. Este material ficou 12 horas no histotécnico (marca AMA®, modelo DM-40), mergulhada em uma solução de álcool absoluto, xilol e parafina a 60°C. No dia seguinte foi feita a inclusão em blocos de parafina a 60°C pelo aparelho inclusor de parafina (marca Lupe®, modelo DP01) e colocados em geladeira. Dois dias após, os blocos de parafina foram cortados em cortes micrométricos de 5µ de espessura através do micrótomo (marca Leica®, modelo

RM2125), colocados em lâminas citológicas e aquecidos em uma estufa a 60°C para escorrer o excesso de parafina. A seguir foi retirado o restante da parafina com banho em xilol e na desidratação da peça fixada nas lâminas passando por lavagem decrescente de álcool (álcool absoluto, álcool 80%, álcool 70%, álcool 50%) e água.

Após as lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina (HE), primeiro ficaram mergulhadas durante 1 minuto na hematoxilina, após serem lavadas com água corrente, ficaram 30 segundos submersos em eosina e para terminar passaram novamente pela lavagem decrescente de quatro álcoois absolutos e xilol. Feito isto elas foram montadas com balsamo entelon e lamínula. Estas lâminas, contendo cortes simulando a cabeça, corpo e cauda do pâncreas, duas por animal, foram examinadas por médico patologista sem saber os grupos de origem.

A análise histológica foi quantitativa e qualitativa. A divisão qualitativa das lesões obedeceram aos seguintes critérios:

- a) **Edema:** na presença de líquido seroso entre as porções acinares, principalmente nos septos.
- b) **Hemorragia:** presença de hemácias fora do leito vascular.
- c) **Necrose Acinar:** caracterizada por alterações citoplasmáticas de microvacuolização com degeneração nuclear em células isoladas (necrose focal) até extensas áreas de necrose isquêmica (necrose difusa).
- d) **Infiltração Leucocitária:** presença de células polimorfonucleares e mononucleares nas áreas de edema e de necrose.

A distribuição quantitativa para a análise do edema foi dividida em graus de 0 a 8, conforme descrito na tabela 2. A avaliação da necrose acinar e da hemorragia foi feita pela contagem de focos de necrose ou hemorragia por campo de alta resolução (CAR), enquanto que a infiltração leucocitária foi feita pela contagem numeral de células CAR. De cada lâmina foram analisados 4 CAR aleatórios (Tabela 2).

Com vistas a ter um resultado de maior precisão, a fim de reduzir os graus de dispersão que podem ocorrer com amostras de número menores de trinta animais por grupo, foi feita outra análise histológica qualitativa através da contagem de células, conforme demonstra a tabela 2.

Tabela 2. Critério Numeral de Escores Histopatológicos

Edema

0	Ausente
1	Expansão focal do septo interlobar
2	Expansão difusa do septo interlobar
3	Igual ao 2 + expansão focal do septo interlobular
4	Igual ao 2 + expansão difusa do septo interlobular
5	Igual ao 4 + expansão focal do septo interacinar
6	Igual ao 4 + expansão difusa do septo interacinar
7	Igual ao 6 + expansão focal do espaço intercelular
8	Igual ao 6 + expansão difusa do espaço intercelular

Hemorragia

0	Ausente
Nº de focos de hemorragia / CAR	

Necrose acinar

0	Ausente
Nº de focos necrose acinar/CAR	

Inflamação ou infiltração leucocitária

0	0-1 leucócitos perivasculares/CAR
Nº de leucócitos perivasculares/CAR	

Os valores numéricos são médias de 4 campos/ lâmina

CAR: campo de alta resolução.

Análise estatística

Para a comparação dos escores histológicos de pancreatite entre os dois grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney⁷¹⁻⁷². Nessas comparações foi adotado o $p < 0.05$ ⁷². Foram utilizadas provas não-paramétricas porque as amostras são independentes, os dados não preenchem os requisitos de aplicabilidade de uma prova paramétrica (distribuição normal, homogeneidade de variância)⁷²⁻⁷³. Foi adotado como nível de rejeição da hipótese de nulidade o valor de 0,05 (5%).

Ética

Estas especificações técnicas de cuidados com os animais estão de acordo com as normas previstas no Guide for the Care na Use of Laboratory Animals⁶⁹.
Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UCS.

RESULTADOS

Foi coletado sangue para dosagem dos níveis de amilase por punção direta do coração dos ratos sacrificados no 1º dia após a LCP, para confirmar o diagnóstico laboratorial de PA. Nesses ratos a média dos níveis de amilase sangüínea no grupo controle foi de 3516,6 U/l ($\pm 1506,66$) e no grupo OHB foi 5428,3 U/l (± 3175).

A título de ilustração serão descritos achados macroscópicos por ocasião da necrópsia. O exame macroscópico da cavidade abdominal revelou a presença de um processo inflamatório no pâncreas e focos de esteatonecrose tipo pingos de velas dispersos na cavidade abdominal que tiveram maior exuberância no grupo sacrificado no 3º dia e quase desapareciam no grupo sacrificado no 7º dia, sem nítida diferença visual entre os dois grupos (figuras 7 a 12). Com exceção de um rato do grupo controle que foi sacrificado no 3º dia, que apresentava pingos de velas em excesso, sinais de sofrimento e distensão das alças intestinais como se fosse um processo de isquemia intestinal, os demais animais não apresentaram diferenças macroscópicas (figura 13).

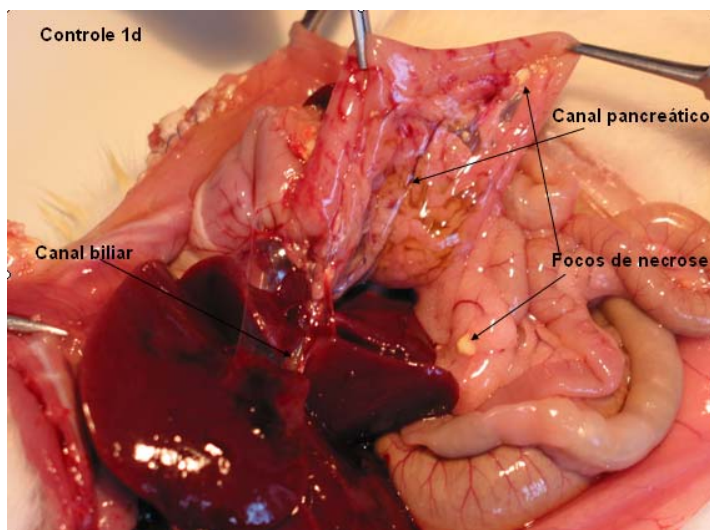


Figura 7. Macroscopia do 1º dia do grupo controle

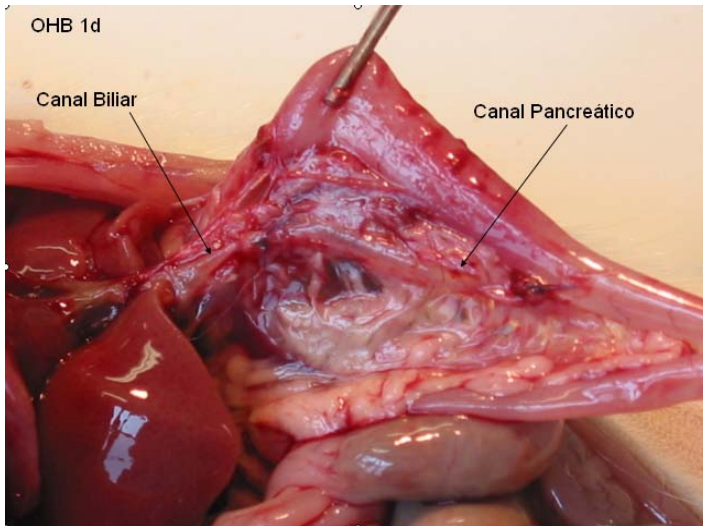


Figura 8. Macroscopia do 1º dia do grupo OHB

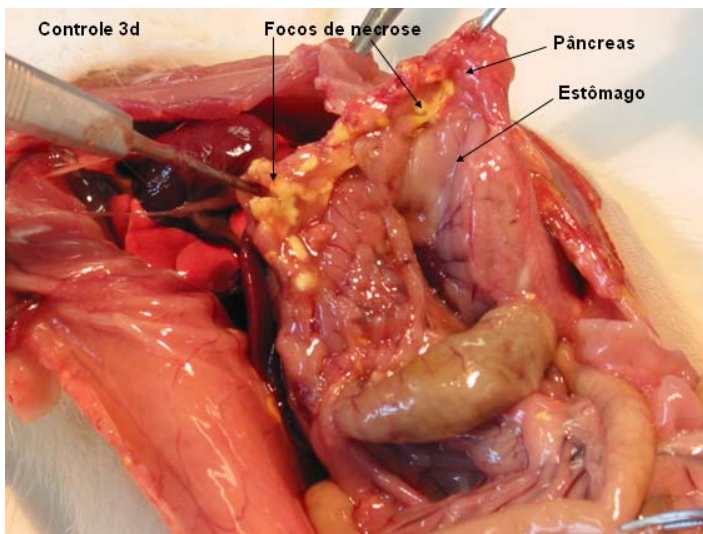


Figura 9. Macroscopia 3º dia do grupo controle

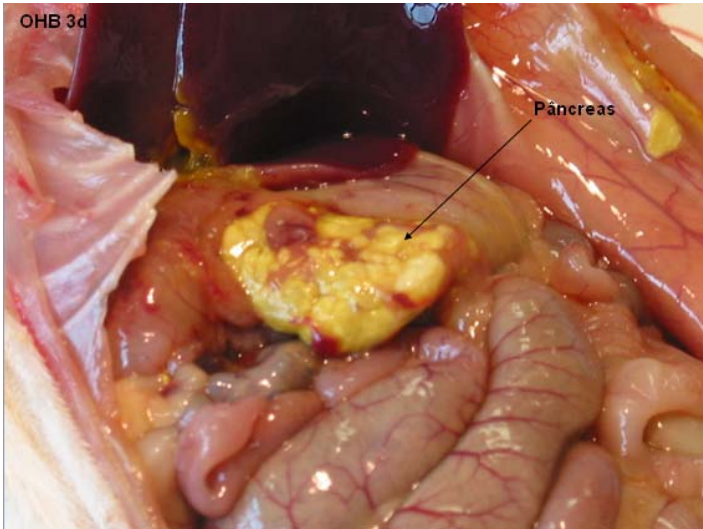


Figura 10. Macroscopia 3º dia do grupo OHB

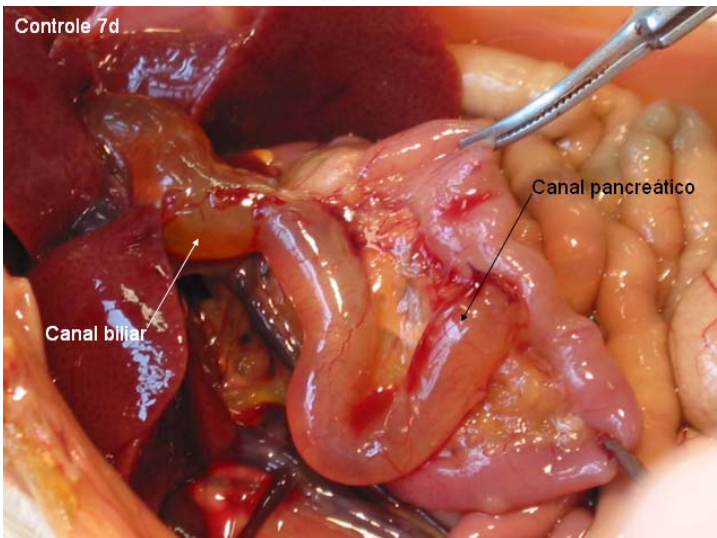


Figura 11. Macroscopia 7º dia do grupo controle

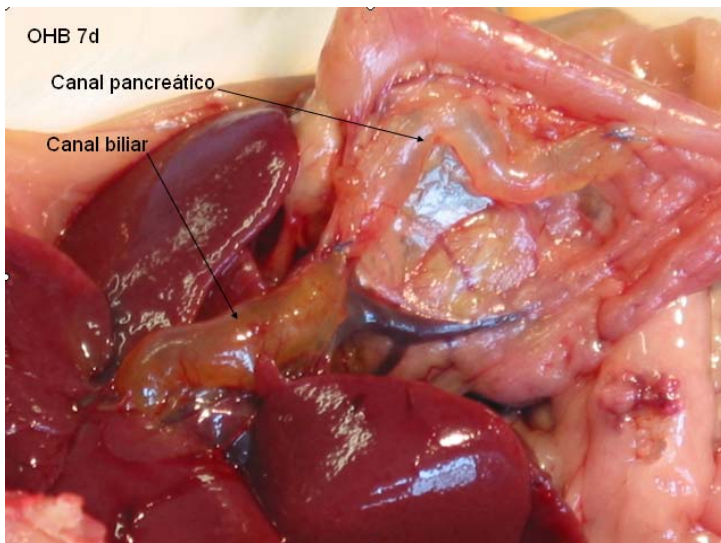


Figura 12. Macroscopia 7º dia do grupo OHB

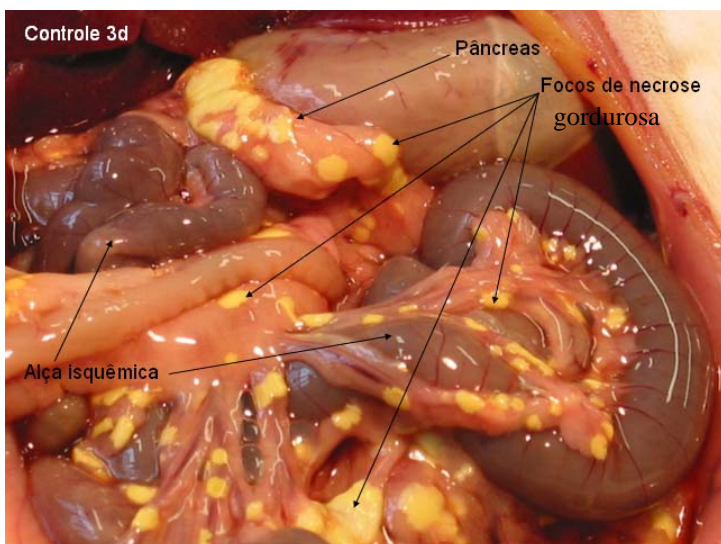


Figura 13. Caso de PA severa

Chama atenção a intensa dilatação das vias biliares e pancreáticas no exame macroscópico dos ratos sacrificados no 7º dia, no grupo controle a média do diâmetro do canal pancreático foi de 5,25 cm ($\pm 0,25$) e no grupo OHB foi de 4,21 cm ($\pm 1,25$), mas não houve diferença significativa entre os dois grupos (figuras 11 e 12). A reação inflamatória do pâncreas era muito pequena e os pingos de velas na cavidade abdominal escassos.

A comparação dos escores histopatológicos entre os dois grupos foi feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar o edema, a necrose, a hemorragia e a infiltração leucocitária.

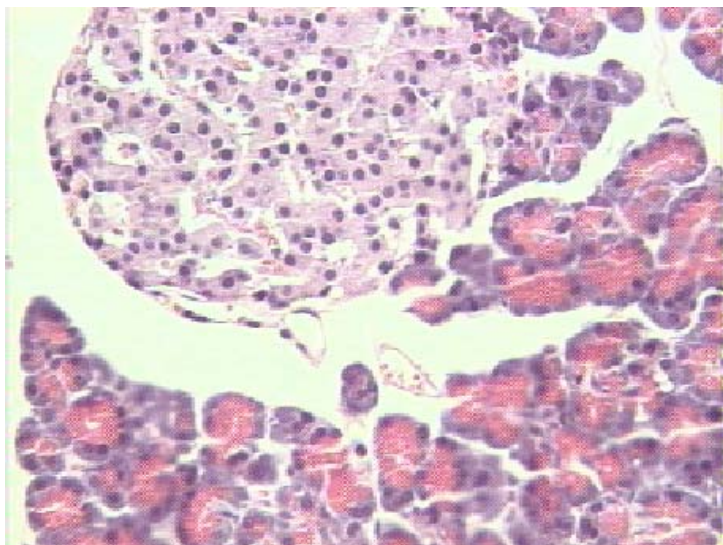


Figura 14. Pâncreas normal. (400X)

Na figura 14 se observa o aspecto histológico do tecido pancreático normal do rato com os ácinos e uma ilhota de Langerhans.

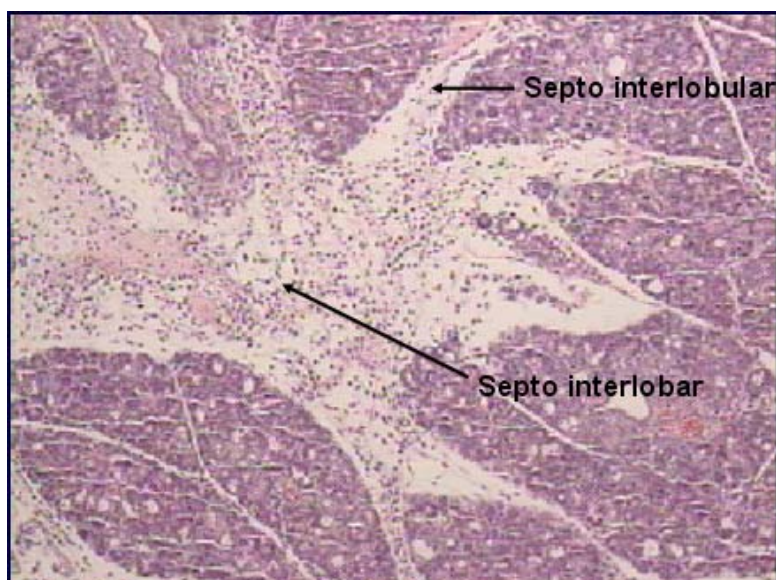


Figura 15. Edema e infiltração leucocitária (100X)

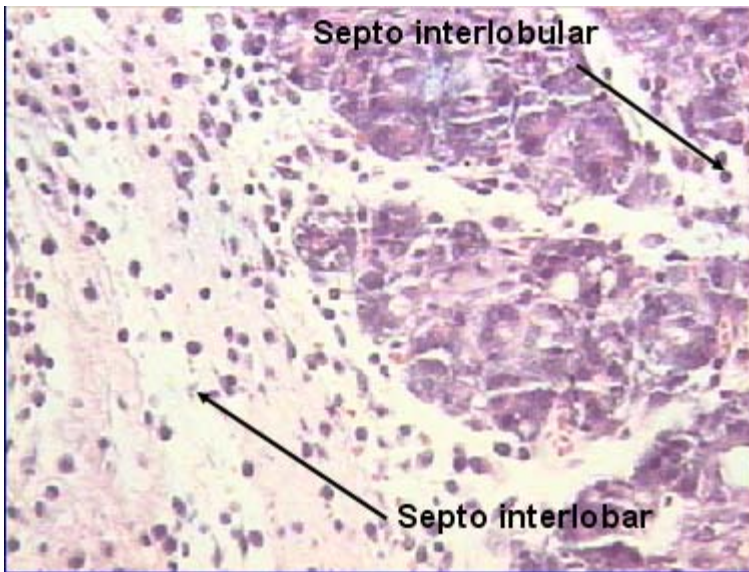


Figura 16. Edema e infiltração leucocitária (400X)

Nas figuras 15 e 16 se pode observar o edema e a infiltração leucocitária promovendo expansão difusa dos septos interlobar e interlobular pancreático.

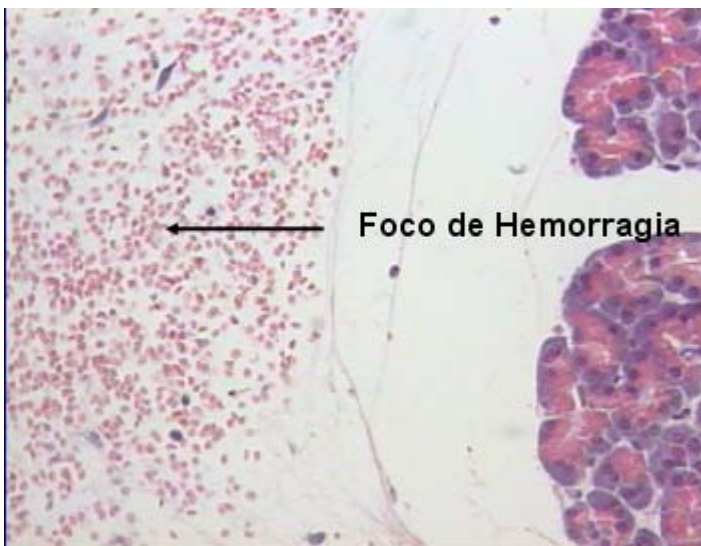


Figura 17. Foco de hemorragia (400X)

Nas figuras 17 está demonstrada a presença de um foco de hemorragia intraparenquimatosa pancreática.

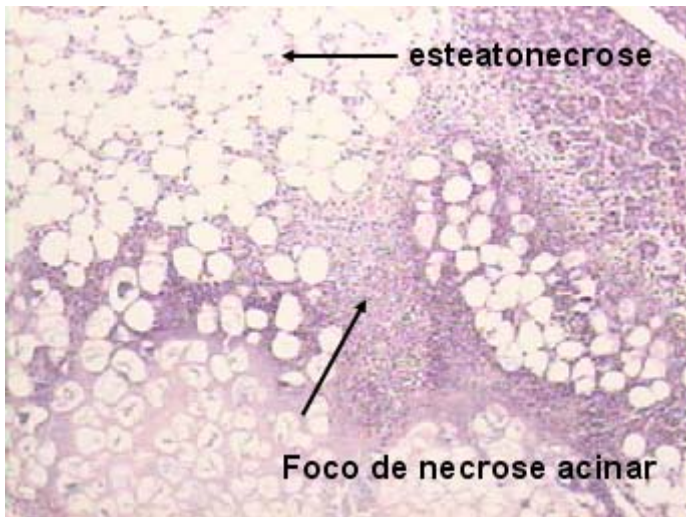


Figura 18. Foco de necrose acinar e esteatonecrose (100X).

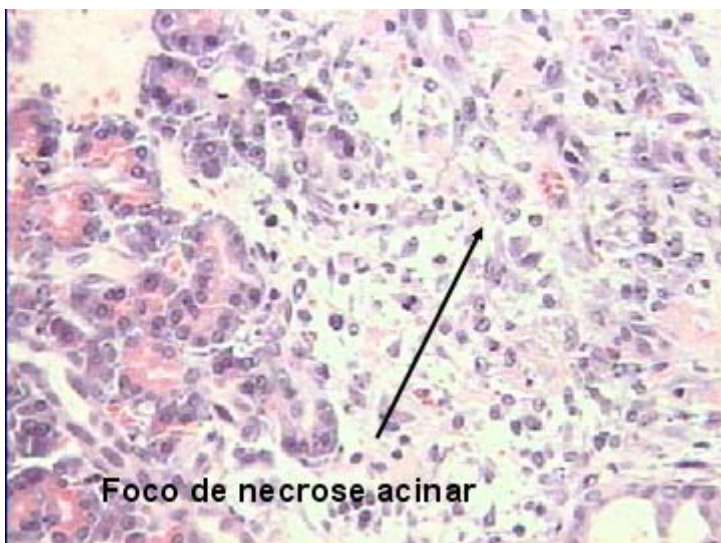


Figura 19. Foco de necrose acinar (400X).

As figuras 18 e 19 demonstram os aspectos histológicos da necrose acinar e da esteatonecrose.

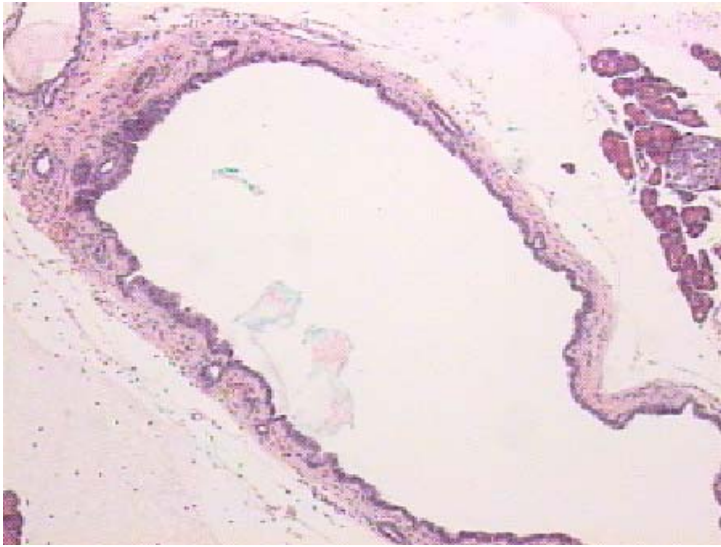


Figura 20. Edema com ectasia do ducto pancreático (100X).

A figura 20 mostra o aspecto histológico do ducto pancreático bastante ectasiado, com edema interlobar, no sétimo dia após a LCP.

Nas Tabelas 3, 4 e 5 estão computados a média dos escores histológicos de cada rato. Foram analisadas 2 lâminas de cada animal e selecionados 4 campos de cada lâmina para fazer a contagem dos escores e depois calculada a média do edema, da necrose, da hemorragia e da infiltração leucocitária (inflamação).

Tabela 3. Média dos escores histopatológicos no 1º dia

1º Dia	Controle								OHB								P
Edema	2,7	3	2,7	3	3	2,3	3	3,5	2,2	2,7	3,7	2,5	0	3,3	3	1,5	0,452
Hemorragia	2	3,3	0	0,3	1,5	1	3	1,5	1,7	2	1	0	0,7	2,7	2	0	0,634
Infilt. PMN	5	11	8	10	12	14	11	18	7,7	8	8,3	14	2	12	12	3	0,317
Necrose	0	0	6,3	4,3	5	1,3	2	6	0	0	0	0	0	0	4,3	2,5	0,03

Tabela 4. Média dos escores histopatológicos no 3º dia

3º Dia	Controle								OHB								P
Edema	0,3	3,5	3,3	1,3	0,7	1,3	2	4,5	5	4	3	2,3	2	2,3	2,5	3,5	0,188
Hemorragia	1,7	3,5	2,7	0	0	0,7	0	6	6	3,7	0,7	0,3	0,3	1,3	0	2	0,791
Infilt. PMN	7,3	18	14	6,3	0	8,3	14	21	27	17	15	8,3	7,7	9,7	6	13	0,243
Necrose	4	2	4,3	0	0	0	0	8	0	3,7	0	0	0	1,7	0	2	0,298

Tabela 5. Média dos escores histopatológicos no 7º dia.

7º Dia	Controle												OHB			P	
Edema	2,7	1	2	1	1,3	3	3	4	2	4	3	2,3	0	0	2	Ó	0,726
Hemorragia	3	0	0	0	0,7	3,3	3,3	3,5	0	1,7	0	0	0	0	0	BI	0,05
Infilt. PMN	14	5	9,7	9,3	4,7	12	16	16	21	19	12	6,3	0	4,7	12	TO	0,862
Necrose	0	0	0	0	0	1	3,3	9	0	2	0	0	0	0	0		0,299

Estudando o resultado das análises comparativas dos escores histológicos entre o grupo controle e o tratado com OHB, iniciando com os ratos sacrificados no primeiro dia, observando os dados da Tabela 3, encontrou-se diferença estatisticamente significativa na média de necrose do pâncreas no grupo de ratos tratados com OHB ($p=0.03$), favorável ao uso da OHB. Na comparação do edema, hemorragia e inflamação do pâncreas entre os grupos dos ratos sacrificados no primeiro dia não se encontrou diferença estatisticamente significativa, respectivamente $p=0,452$; $p=0,634$ e $p=0,317$. Corroborando com estes dados, os Gráficos 1, 2,3 e 4, mostram de maneira espacial estes achados histológicos.

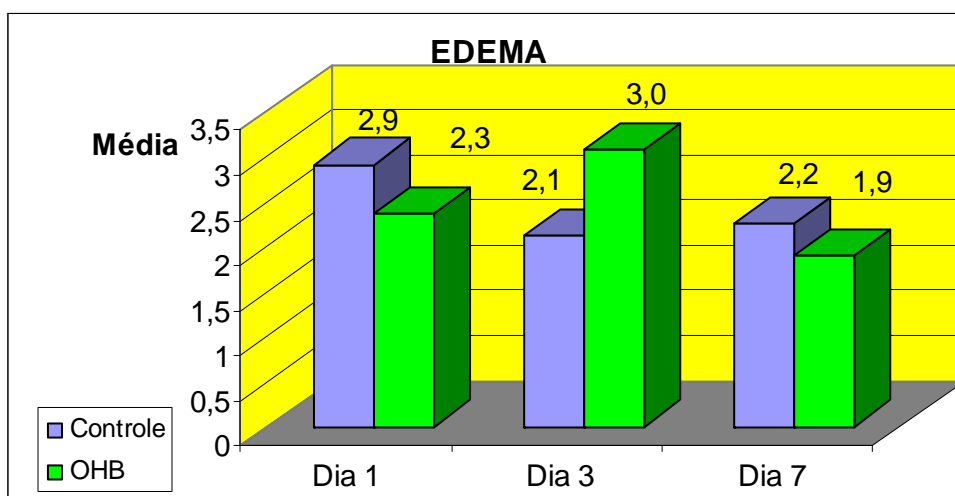


Gráfico 1. Média dos escores de edema.

A análise estatística dos dados da Tabela 4 e dos Gráficos 1, 2, 3 e 4 dos achados histológicos no terceiro dia demonstram que a OHB não tem efeito benéfico estatisticamente significativo em nenhum dos parâmetros estudados (edema $p=0,188$; hemorragia $p=0,791$; necrose $p=0,298$ e infiltração leucocitária $p=0,243$). Embora a média dos escores histológicos de necrose sejam menores (Gráfico 4), os índices de edema e inflamação são maiores (Gráfico 1 e 3).

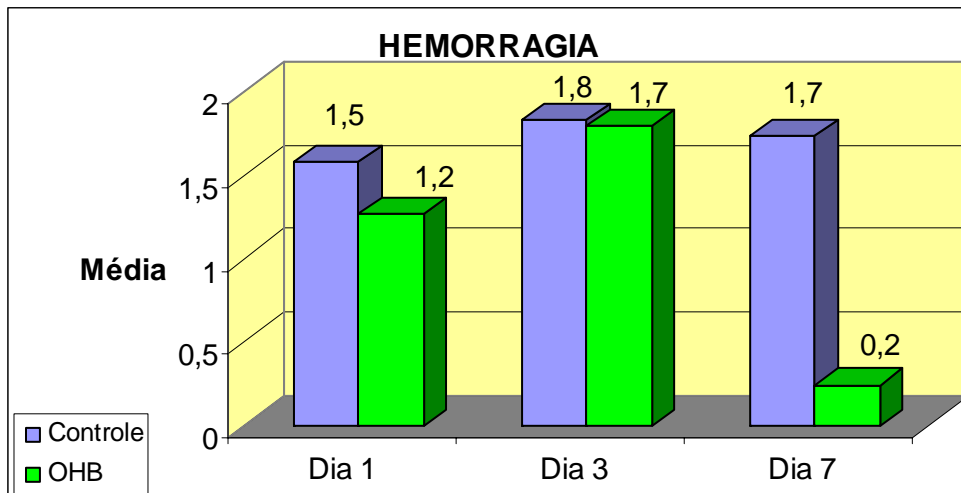


Gráfico 2. Média dos escores de hemorragia.

No grupo de ratos sacrificados no sétimo dia houve uma perda acidental de um dos animais que receberam OHB. Embora o Gráfico 4 mostre um benefício com menor escore de necrose, não foi estatisticamente significativo ($p=0,299$). Os índices de edema e infiltração leucocitária não apresentam diferença entre os grupos ($p=0,726$ e $p=0,862$, respectivamente). Entretanto, há um benefício estatisticamente significativo ($p=0,05$), na redução dos escores de hemorragia.

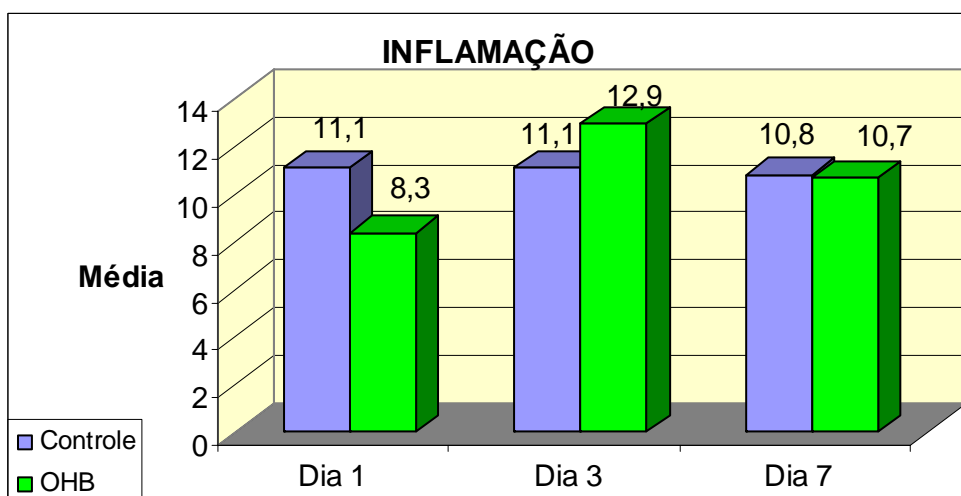


Gráfico 3. Média dos escores da Infiltração Leucocitária

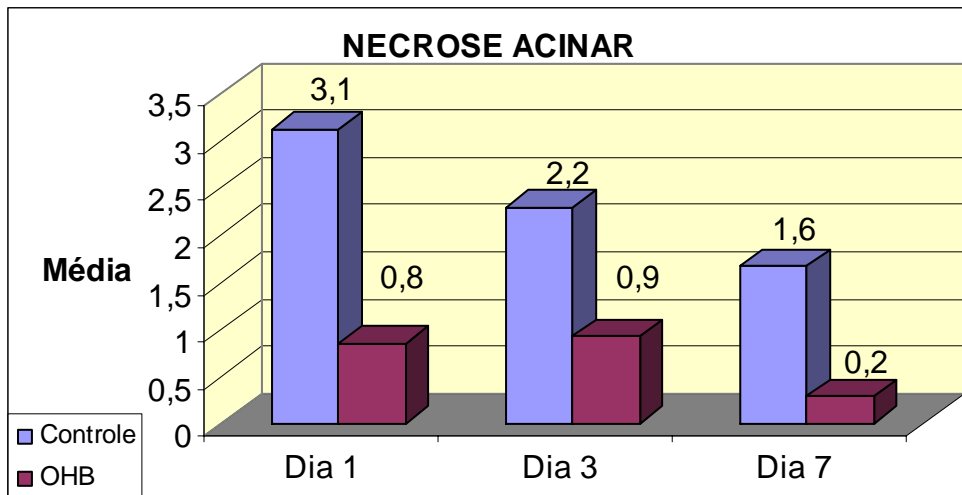


Gráfico 4. Média dos escores da Necrose Acinar

DISCUSSÃO

Apesar de inúmeros estudos clínicos e experimentais sobre efeitos de vários medicamentos na PA, não há um consenso que permita dizer que já existe um medicamento realmente eficaz, capaz de mudar a historia natural da doença, reduzindo a morbidade e a mortalidade⁷⁴.

Devido a heterogeneidade desta doença e dos vários modelos experimentais, é difícil reproduzir integralmente o quadro da doença dos humanos⁷⁵. Não há um modelo experimental considerado ideal para reproduzir a PA. Aquele a ser utilizado deve ser escolhido conforme as exigências do estudo⁷⁵.

O modelo da injeção retrógrada de sais biliares no ducto pancreático é tecnicamente difícil e está associado com alta mortalidade e muitas perdas⁵⁹. A hiperestimulação pancreática com ceruleína endovenosa, subcutânea ou intraperitoneal determina pancreatite dose dependente e o produto depende de importação^{60,75}. A PA experimental pela dieta deficiente em colina suplementada com etionina produz um quadro grave e letal^{62,63,75}.

A aplicação de L-arginina intraperitoneal é um modelo muito simples, de fácil aplicação, de baixa mortalidade e que permite que os ratos sobrevivam longo tempo^{67,68}. Tem o inconveniente de ser necessário a seleção dos ratos, porque quando o peso dos animais ultrapassa 200g, a dose de L-arginina provoca a morte em menos de 24hs. Em nosso estudo piloto, num grupo de 20 ratos com peso de 238 a 318g que receberam L-arginina a 20% intraperitoneal, nove de 10 ratos do grupo controle morreram nas primeiras 24h e 5 do grupo OHB, por desidratação.

O modelo da alça duodenal fechada se mostrou bastante atraente, mas devido a curta sobrevida não pode ser empregado⁵⁸.

Foi selecionado para o presente estudo, um outro modelo semelhante, o da ligadura do canal pancreático junto ao duodeno e da via biliar próximo do fígado, porque é de fácil execução e reprodução, mesmo em ratos, animais de fácil obtenção e a possibilidade de aparecimento de lesões histológicas como edema, necrose, hemorragia e infiltração leucocitária. Além disso, mimetiza a PA biliar e permite que o animal viva mais de 14 dias⁶⁶. É um modelo que tem mortalidade

mínima porque não desenvolve um quadro de PA severa. Não tem relato do uso deste modelo para pesquisa dos efeitos da OHB na PA.

Durante este estudo ocorreu uma perda, que foi o rato nº 44, pertencente ao grupo tratado com OHB que seria sacrificado no 7º dia. Este rato, no 3º dia após a cirurgia, se apresentava bastante ativo e no momento em que se fazia a troca da caixa grande para a pequena, correndo pelo braço do auxiliar, caiu no chão. Vivo, foi recolocado na sua caixa, onde se manteve quieto e se movimentando pouco. No dia seguinte estava morto. A necropsia demonstrou focos de necrose no pâncreas e alguns focos de necrose no mesentério, pequeno volume de líquido de ascite, nada diferente dos ratos que foram necropsiados no 3º dia.

A técnica da LCP desencadeou PA comprovada por dosagem de amilase sangüínea coletado por punção direta do coração e pelos achados macroscópicos.

O estudo histológico foi realizado com o objetivo de comparar os efeitos da OHB sobre as lesões teciduais desenvolvidas neste modelo de PA provocada pela LCP. Como este estudo compara os achados histológicos entre dois grupos, não importando o grau de severidade, já que precisávamos que os animais permanecessem vivos por longo tempo, utilizamos como base para orientação dos critérios a serem pesquisados o modelo de escore descrito por Schmidt e colaboradores⁶⁶.

Nesse modelo foi feita a análise do edema baseado nos escores de edema do trabalho de Schmidt. Quanto aos outros dados, foi feita a contagem dos focos de hemorragia, a contagem do número de leucócitos e a contagem do número de focos de necrose em 3 segmentos. Os valores encontrados foram transformados em médias (Tabela 3,4 e 5) e submetidos a análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

A análise dos dados das Tabelas 3, 4 e 5, dos Gráficos 1, 2, 3 e 4 permite observar que o edema no primeiro dia é menor no grupo que recebeu OHB, aumenta para o terceiro dia, mas no grupo OHB ele se apresenta maior que no grupo controle, sem diferença estatística ($p=0,170$). No sétimo dia ocorreu menos edema, mas sem diferença significativa entre os grupos ($p=0,726$). A ocorrência de mais edema no grupo tratado com OHB do que no grupo controle, no terceiro dia, não condiz com o esperado, já que está descrito que a OHB reduz o edema, porque

a hiperóxia provoca vasoconstrição, reduzindo o aporte de sangue arteriolar, mas sem alterar o fluxo sangüíneo venular. Além disso, reduziria a agregação plaquetária e inibindo a adesividade dos PMN ao endotélio capilar melhorando a microcirculação. A vasoconstrição não aumenta a isquemia porque o O₂ diluído no plasma atinge concentrações além do necessário para suprir os tecidos^{41,53,54,55}.

A discordância dos nossos achados com os da literatura pode estar relacionado com o modelo utilizado nesta pesquisa, ou com a aplicação de uma só sessão de OHB por dia que poderia ser insuficiente para reduzir o edema, já que a duração do efeito da hiperóxia varia de minutos a horas conforme o tecido lesado, assim como não sabemos qual seria a pressão em ATA mais indicada para ser utilizada no tratamento desses casos. A dificuldade reside no fato de não existirem outros estudos com esse modelo na literatura^{41,53}.

Estudando a freqüência dos focos hemorrágicos (Gráfico 2) e Tabelas 3, 4 e 5, foram encontrados poucos focos no primeiro dia, embora em menor número no grupo OHB, mas sem diferença estatística ($p=0,634$). No terceiro dia ocorreu uma elevação, porém mínima e sem diferença estatística ($p=0,791$). No sétimo dia houve uma queda acentuada no grupo OHB e com diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$). Estes dados podem ser explicados pela melhora do fluxo sangüíneo capilar, redução da adesão dos leucócitos no endotélio, evitando a liberação de citocinas e RLO^{41,51,76,77,78}.

A contagem do número de leucócitos apresentou uma pequena elevação no primeiro em relação ao terceiro dia e após uma leve diminuição até o sétimo dia e sem diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos ($p=0,317$, $p=0,713$ e $p=0,862$) respectivamente. Interessante o fato de que o grupo que recebeu OHB teve uma contagem maior que o grupo controle no terceiro dia. Da mesma forma que no edema, o esperado era que o número de leucócitos subisse, mas que tivesse uma média inferior ao controle. Justifica-se com os mesmos argumentos que foram apresentados na avaliação do edema pancreático.

Entretanto, a análise da contagem dos focos de necrose acinar (Gráfico 4) (Tabela 3, 4 e 5) mostrou que no grupo tratado com OHB houve uma redução expressiva do primeiro para o sétimo dia, com diferença estatisticamente significativa no primeiro dia ($p=0,03$), e com tendência no sétimo dia ($p=0,898$ no 3d e $p=0,299$ no 7d). Estes são os efeitos esperados quando se utiliza a OHB, porque a hiperóxia

viabiliza e recupera os tecidos em hipóxia pelos mecanismos já descritos, evitando a progressão da necrose celular^{41,51,76,77,78,79}.

Nem todos os modelos animais têm mostrado resultados benéficos com o uso da OHB. Gronroos e colaboradores, estudando os efeitos morfométricos sobre a necrose pancreática em um modelo de PA induzida pela injeção intraductal de taurocolato, observaram que o grupo tratado com OHB apresentava uma tendência a reduzir os níveis de necrose, mas sem significância estatística⁸⁰. Degertekin e colaboradores constataram que a OHB teve efeitos deletérios em um modelo de PA induzida por uma dieta deficiente em colina e suplementada com etionina⁸¹.

CONCLUSÕES

Neste modelo de pancreatite aguda induzida pela ligadura do canal pancreático e biliar, a oxigenioterapia hiperbárica.

- 1º) Reduziu o número de células necróticas
- 2º) Reduziu os focos de hemorragia após aplicações sucessivas
- 3º) Não teve efeito sobre o edema pancreático e a infiltração leucocitária.

PERSPECTIVAS

Considerando o crescente número de trabalhos sobre o uso da oxigenioterapia hiperbárica no tratamento da pancreatite aguda, as controvérsias existentes em seu uso e os achados conflitantes, mas interessantes deste trabalho, abrem-se perspectivas para o prosseguimento deste estudo. Novos experimentos ou ensaios adequando ou testando o tempo e a pressão de exposição dos animais a OHB, dosagens de radicais livres de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, malondealdeído), assim como os anti-radicais livres de oxigênio (SOD, catalase, peroxidase, etc.) são alguns tópicos a serem desenvolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradley EL 3rd: A clinically based classification system for acute pancreatitis. *Ann Chir* 1993; 47(6): 537-41.
2. Denham W, Norman J. The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79(4): 767-81.
3. Karne S, Gorelick FS. Etiopathogenesis of acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79(4): 641-651.
4. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol* 2000;30(4):343-56.
5. Banks PA. Acute Pancreatitis: Clinical presentation. In: Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Lebenthal E, DiMagno E, Scheele GA, eds. *The Exocrine Pancreas*. New York: Raven Press, 1985, pp. 475-480.
6. McKay CJ, Imrie CW. The continuing challenge of early mortality in acute pancreatitis. *BJS* 2004; 91(10): 1243-4.
7. Bialek R, Willeme S, Arnold R, and Adler G. Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute cerulein-induced pancreatitis in rats. *Scand. J. Gastroenterol* 1991; 26 (2): 190-6.
8. Niederau C, Luthen R. Events inside the pancreatic acinar cell in acute pancreatitis: role of secretory blockade, calcium release, and dehydration in the initiation of trypsinogen activation and autodigestion. In: Lankisch PG, DiMagno EP, eds. *Pancreatic disease; state of the art and future aspects of research*. Berlin: Springer Ed, 1999:14-23.
9. Wang XD, Deng XM, Haraldsen P, Andersson R, Ihse I. Antioxidant and calcium channel blockers counteract endothelial barrier injury induced by acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1995;30(11):1129-36.
10. Formela JL, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995;82(1):6-13.
11. Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29(7):674-83.
12. Seo JY, Kim H, Seo JT, Kim KH. Oxidative stress induced cytokine production in isolated rat pancreatic acinar cells: effects of small-molecule antioxidants. *Pharmacology* 2002; 64(2): 63-70.
13. Tamura K, Manabe T, Imanishi K, Nishikawa H, Ohshio G, Tobe T. Toxic effects of oxygen-derived free radicals on rat pancreatic acini; an in vitro study. *Hepatogastroenterology* 1992;39(6):536-9.

14. Tamura K, Manabe T, Kyogoku T, Andoh K, Ohshio G, Tobe T. Effect of postischemic reperfusion on the pancreas. *Hepatogastroenterology* 1993;40(5):452-6.
15. Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 2002;82(10):1359-68.
16. Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001;96(1):56-67.
17. Telek G, Scoazec JY, Chariot J, Ducroc R, Feldmann G, Roz C. Cerium-based histochemical demonstration of oxidative stress in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. A confocal laser scanning microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1999;47(9):1201-12
18. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 2005;24 Suppl 1:45-51.
19. Beger HG, Bittner R, Block S and Buchler. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. *Gastroent* 1986; 91(2): 433 – 8.
20. Wang XD, Wang Q, Andersson R, Ihse I. Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model. *Br J Surg* 1996;83(11):1537-43.
21. Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8(3):187-94.
22. Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, Murakami H, Harada A, Nonami T, et al. LFA-1 (CD11a/CD18) and ICAM-1 (CD54) antibodies attenuate superoxide anion release from polymorphonuclear leukocytes in rats with experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 1996;12(2):183-8.
23. Ito T, Nakao A, Kishimoto W, Nakano M, Takagi H. The involvement and sources of active oxygen in experimentally induced acute pancreatitis. *Pancreas* 1996;12(2):173-7.
24. Pezzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B. Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997;42(7):1469-72.
25. Hotter G, Closa D, Prats N, Pi F, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Free radical enhancement promotes leucocyte recruitment through a PAF and LTB4 dependent mechanism. *Free Radic Biol Med* 1997;22(6):947-54.
26. Norman J, Denham W, Chapman V, Fink G and Yang J: TNF induces acinar cells apoptosis during acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 112(: A468.

27. Cuzzocrea S ME, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, McDonald M C, de Sarro A, Caputi P, Thiernemann C. Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice. *Cytokine* 2002;18(5):274-85.
28. Keck T. Site-specific therapeutic effects of protease inhibitors: effect of route of administration in experimental pancreatitis. *Pancreatol* 2001;1(6):656-61.
29. Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, et al. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003;3(2):156-63.
30. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of cerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 1999;377(1):1-11.
31. Czako L HP, Takacs T, Gog C, Farkas A, Mandy Y, Varga I S, Tiszlavicz L, Lonovics J. Effects of octreotide on acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *World J Gastroenterol* 2004;10(14):2082-6.
32. Tanyalcin T, Sozmen EY, Taskiran D, Ozutemiz O, Batur Y, Kutay F. The endogenous scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33(4):195-9.
33. Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, et al. Oxidative stress in distant organs and the effects of allopurinol during experimental acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000;27(3):209-16.
34. Hausmann DH, Porstmann T, Weber I, Hausmann S, Dummler W, Liebe S, et al. Cu/Zn-SOD in human pancreatic tissue and pancreatic juice. *Int J Pancreatol* 1997;22(3):207-13.
35. Bernal CS, Morales G, Dominguez C, Martin-Gallan P, Calvo JJ, Ferreira L, et al. Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis. *Pancreas*. 2004, 28(1):e9-e15.
36. Abdo EE, Machado, M. C., Coelho, A. M., Sampietre, S. N., Leite, K. R., Molan, N. A., Pinotti, H. W. [Antioxidative effect of N2-mercaptopyrionylglycine (N2 MPG) in experimental acute pancreatitis]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1998;53(4):169-73.
37. Weber H, Roesner JP, Nebe B, Rychly J, Werner A, Schroder H, et al. Increased cytosolic Ca²⁺ amplifies oxygen radical-induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion* 1998;59(3):175-85.
38. Folch E, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Closa D. Free radicals generated by xanthine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure. *Dig Dis Sci* 1998;43(11):2405-10.

39. Araki Y, Andoh A, Yokono T, Asano N, Yoshikawa K, Bamba S, et al. The free radical scavenger edaravone suppresses experimental closed duodenal loop-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Mol Med* 2003;12(1):121-4.
40. Alsfasser G, Gock M, Herzog L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E, et al. Glutathione depletion with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine demonstrates deleterious effects in acute pancreatitis of the rat. *Dig Dis Sci* 2002;47(8):1793-9.
41. Cuthbertson C M CC. Potential effects of hyperbaric oxygen therapy in acute pancreatitis. *ANZ J Surg* 2006;76(7):625-30.
42. Cuthbertson CM CC. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006;93(5):518-30.
43. Tsang SW, Ip SP, Leung PS. Prophylactic and therapeutic treatments with AT 1 and AT 2 receptor antagonists and their effects on changes in the severity of pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(2):330-9.
44. Tsang SW, Cheng CH, and Leung PS. The role of the pancreatic renin-angiotensin system in acinar digestive enzyme secretion and in acute pancreatitis. *Regul Pept* 2004; 119(3): 213-9.
45. Tsuji N, Watanabe N, Okamoto T, Niitsu Y. Specific interaction of pancreatic elastase and leucocytes to produce oxygen radicals and its implication in pancreatitis. *Gut* 1994;35(11):1659-64.
46. Yu JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. NADPH oxidase mediates interleukin-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(7):1458-69.
47. Tsukahara Y, Morisaki T, Horita Y, Torisu M, Tanaka M. Phospholipase A2 mediates nitric oxide production by alveolar macrophages and acute lung injury in pancreatitis. *Ann Surg* 1999;229(3):385-92.
48. Gomez G, Englander EW, Wang G, Greeley GH, Jr. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, p48, and the Notch signaling cascade during acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 2004;28(1):58-64.
49. Shi C, Zhao X, Wang X, Andersson R. Role of nuclear factor-kappaB, reactive oxygen species and cellular signaling in the early phase of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2005;40(1):103-8.
50. Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 2005;5(4-5):492-500.
51. Yasar M, Yildiz S, Mas R, Dundar K, Yildirim A, Korkmaz A, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Physiol Res* 2003;52(1):111-6.

52. Isik AT, Mas MR, Comert B, Yasar M, Korkmaz A, Akay C, et al. The effect of combination therapy of hyperbaric oxygen, meropenem, and selective nitric oxide synthase inhibitor in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2004;28(1):53-7.
53. Hammarlund C. The physiologic effects of hyperbaric oxygenation. In: Kindwall EP & Whelan HT. *Hyperbaric Medicine Practice*. 2nd ed Best Publishing Company, Flagstaff, 37-67 p. 1999.
54. Jain KK. *Textbook of Hyperbaric Medicine*, 3^a Ed. Hogrefe & Huber Publisher, Seattle, 673p, 1999.
55. Festugato M, Neuwald R. Oxigênio-terapia hiperbárica: efeitos, indicações e contra-indicações. Caxias do Sul, RS: Educs, 2004, 86p.
56. McKay CJ and Imrie CW. Staging of acute pancreatitis. Is it important? *Surg Clin North Am*, Aug 1999; 79(4): 733-43.
57. Singer M. Management of multiple organ failure: guidelines but no hard-and-fast rules. *J Antimicrob Chemother* 1998;41 Suppl A:103-12.
58. Wendt LRR, Da Costa MSTB, Edelweiss MIA and Rohde L. Pancreatite aguda induzida pela técnica da alça duodenal fechada: modelo experimental em ratos. *Rev. Amrigs* 2001; 45(3,4): 129- 34
59. Aho HJ, Koskensalo SM, and Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15(4): 411-6.
60. Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 1985; 88(5 pt 1): 1192-204.
61. Shibayama Y. Pancreatic venous stasis and endotoxaemia as aetiologic factors in acute haemorrhagic pancreatitis. *J Pathol* 1987; 152(3): 177-82.
62. Manabe T and Steer ML. Protease inhibitors and experimental acute hemorrhagic pancreatitis. *Ann Surg* 1979; 190(1): 13-7.
63. Coelle EF, Adham N, Elashoff J, Lewin K and Taylor IL. Effects of prostaglandin and indomethacin on diet-induced acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 1983; 85(6): 1307-12
64. Ha S, Satake K, Hiura A and Nishiwaki H. Effect of a new cholecystokinin receptor antagonist (KSG 504) on the early stage of the healing process in acute pancreatitis induced in rats by the closed duodenal loop technique. *Pancreas* 1994; 9(4): 501-7.
65. Nevalainen TJ and Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10(5): 521-7.

66. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215(1): 44-56.
67. Ramos Jr O, Leitão OR, Repka JCD and Barros SGS. Pancreatite aguda experimental induzida pela L-arginina: avaliação histológica e bioquímica. *Arq Gastr* 2005; 42(1):55-9.
68. Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T et al. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci* 1990; 35(3): 367-74.
69. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Institute of Health. 1985.
70. Samuel I, Toriumi Y, Yokoo H, Wilcockson DP, Trout JJ, and Joehlet RJ. Ligation-induced acute pancreatitis in rats and opossumus: a comparative morphologic study of the early phase. *J Surg Res* 1994; 57(2): 299-311.
71. Guedes MLS, Guedes JS. Bioestatística. Rio de Janeiro, Livro Técnico S.A./CNPQ, 1988.
72. Motta VT, Wagner MB. Bioestatística. Caxias do Sul: Educus, São Paulo: Robe Ed., 2003.
73. Siegel S. Estatística não-paramétrica para as Ciências do Comportamento. Tradução de Alfredo Alves de Farias. São Paulo, McGraw-Hill, 1975.
74. Buchler MW, Binder M, Friess H. Role of somatostatin and its analogues in the treatment of acute and chronic pancreatitis. *Gut*, 1994; 35(3 Suppl): S15-9.
75. Kaplan O, Kaplan D, Casif E, Siegal A, Paran H, Graf E et al. Effects of delayed administration of octreotide in acute experimental pancreatitis. *J Surg Res* 1996; 62(1): 109-17.
76. Zamboni WA, Wong HP, Stephenson LL, Effect of hyperbaric oxygen on neutrophil concentration and pulmonary sequestration in reperfusion injury. *Arch.Surg* 1996; 131(7): 756-60.
77. Hong JP, Kwon H, Chung YK and Jung SH . The Effect of Hyperbaric Oxygen on Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study in a Rat Musculocutaneous Flap. *Annals of Plastic Surgery* 2003; 51(5):478-87.
78. Kalns J, Lane J, Delgado A, Scruggs J, Ayala E, Gutierrez E, et al. Hyperbaric oxygen exposure temporarily reduces Mac-1 mediated functions of human neutrophils. *Immunol Lett* 2002; 83(2): 125-31.
79. Chen HM, Shyr MH, Ueng SW and Chen MF. Hyperbaric oxygen therapy attenuates pancreatic microcirculatory derangement and lung edema in an acute experimental pancreatitis model in rats. *Pancreas* 1998;17(1):44-9.

80. Gronroos JM, Ronka R, Laine J and Nevalainen TJ. No effect of hyperbaric oxygen therapy on sodium taurocholate induced pancreatic necrosis in the rat. *Eur J Underwater and Hyperb Med* 2002; 3(2): 113-5.
81. Degertekin H, Ertan A, Yater RD, et al. Hyperbaric oxygen, allopurinol, and diet-induced acute pancreatitis. *Ann Intern Med* 1985; 103(3): 474-5.