

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Efeitos do Cloreto de Gadolínio no Tratamento da Pancreatite Aguda
Experimental Induzida por Tauracolato de Sódio em Ratos

Dissertação de Mestrado

DIEGO DA FONSECA MOSSMANN

Orientador: PROF. DR. ALESSANDRO BERSCH OSVALDT

Porto Alegre, janeiro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Efeitos do Cloreto de Gadolínio no Tratamento da Pancreatite Aguda
Experimental Induzida por Tauracolato de Sódio em Ratos

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Cirúrgicas

DIEGO DA FONSECA MOSSMANN

Orientador: PROF. DR. ALESSANDRO BERSCH OSVALDT

Porto Alegre, janeiro de 2009

M913e Mossmann, Diego da Fonseca

Efeitos do cloreto de gadolínio no tratamento da pancreatite aguda experimental induzida por tauracolato de sódio em ratos / Diego da Fonseca Mossmann ; orient. Alessandro Bersch Osvaldt. – 2009.

100 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

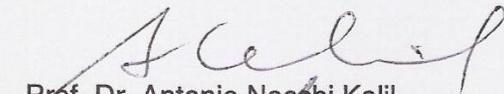
1. Pancreatite necrosante aguda 2. Terapia 3. Modelos animais de doenças 4. Ratos 5. Gadolínio 6. Ácido taurocólico I. Osvaldt, Alessandro Bersch II. Título.

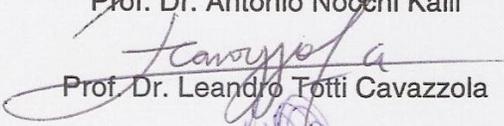
NLM: WI 805

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

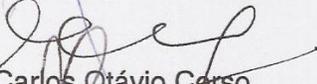
ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 150

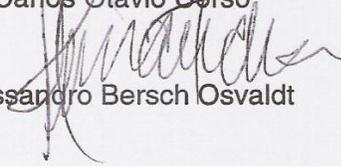
Aos quatorze dias do mês de janeiro do ano de dois mil e nove, às 9:00 horas, no Auditório Mário Rigatto da Faculdade de Medicina, ocorreu a apresentação pública da Dissertação de Mestrado intitulada "Efeitos do cloreto de gadolínio no tratamento da pancreatite aguda experimental induzida por tauracolato de sódio em ratos" do aluno **Diego da Fonseca Mossmann**, sob orientação do **Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt**. A Banca foi presidida pelo orientador, Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt. Compuseram a banca os Professores Dr. Antonio Nocchi Kalil (UFCSPA), Dr. Leandro Totti Cavazzola (UFCSPA), Dr. André Ricardo Pereira da Rosa (HCPA) e Dr. Carlos Otávio Corso (deste Programa). O candidato dispôs de 45 minutos para expor o tema. Em seguimento, o Senhor Presidente passou a palavra aos membros da Banca para argüição, cabendo ao candidato 15 minutos para responder a cada examinador. Finalizando o Senhor Presidente anunciou os conceitos emitidos pelos Senhores Membros da Banca: Prof. Dr. Antonio Nocchi Kalil, conceito **A** ; Prof. Dr. Leandro Totti Cavazzola, conceito **A** , Prof. Dr. André Ricardo Pereira da Rosa, conceito **A** Prof. Dr. Carlos Otávio Corso, conceito **A** .Do que para constar, eu, Estela Maris Araripe, secretária, lavrei a presente ata que segue assinada pelos Professores Examinadores e pelo Professor Orientador.


Prof. Dr. Antonio Nocchi Kalil


Prof. Dr. Leandro Totti Cavazzola


Prof. Dr. André Ricardo Pereira da Rosa


Prof. Dr. Carlos Otávio Corso


Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt

À minha esposa **Vanessa**,

Pelo seu amor, carinho e companheirismo que tornam a minha vida cada dia mais feliz.

Aos meus pais **Felipe e Véra,**

Por me amarem desde antes de nascer e;

Pelo contínuo incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu irmão **Guilherme,**

Pelo carinho, amor e amizade.

Ao professor, orientador e amigo,

Alessandro Bersch Osvaldt,

Exemplo de persistência e

competência na busca de seus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a algumas pessoas que deram contribuições essenciais para a realização deste estudo:

À professora Dr^a. **Maria Isabel Albano Edelweiss**, do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo carinho, amizade, dedicação, empenho e precisão na realização da análise histológica pancreática.

À professora do Departamento de Patologia da UFRGS, Dr^a. **Jane Maria Kulczynski**, pela sua paciência, persistência e presteza no auxílio na digitalização das lâminas de pulmão e na análise da histopatologia pulmonar.

Ao Dr. **Dennis Baroni Cruz**, residente do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio na digitalização das lâminas e análise histopatológica.

À Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA e, em especial, à Prof^a. Dr^a. **Roseli de Oliveira Möllerke** (*in memoriam*) pelo seu auxílio e incentivo prestado na realização do experimento, e pelo empenho na aquisição dos animais junto a FURG e FEEPS. A sua dedicação e prestimosidade levo como exemplo.

Ao médico veterinário **Marcos Eugênio Soares Duarte**, que, apesar do pouco tempo de contato, teve participação fundamental para a padronização do experimento.

Aos biólogos **Eduardo Mottola Amaro da Silveira** e **Tânia Mara Santoro Peres** pela atenção e presteza no auxílio durante a experimentação animal.

Aos alunos de Medicina Veterinária **Fernando Barreto Martens**, **Fernanda Veit** e **Sheila Beatriz Laurindo Bernardes** pelo auxílio fundamental na técnica anestésica e no cuidado dos animais.

À secretária **Fabiana Silva da Silva** pela competência, auxílio e disponibilidade.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA e à Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde pelo apoio ao projeto.

À administradora Sr^a. **Rosane Paixão Schlatter** pela ajuda na realização do orçamento do projeto.

À bioquímica **Carmen Pilla** pelo apoio, disponibilidade e competência no preparo das substâncias químicas utilizadas no experimento e na dosagem bioquímica.

À **Daniela Benzano Bumaguin** pela qualificada consultoria na análise estatística.

Ao Setor de Compras do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Sr. **Daniel Gomes Portella** pelo empenho na aquisição dos materiais necessários para a experimentação.

Aos acadêmicos **Catiele Antunes** e **Oscar Augusto Birkhan** pelo auxílio essencial no experimento.

À Sr^a. **Marta Regina Dotto** pela disponibilidade, empenho, e auxílios prestados desde o início do projeto.

Ao Sr. **Jorge Alberto Lopes**, funcionário do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA, pela presteza no processamento histológico e confecção das lâminas.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio financeiro prestado.

À Dr^a. **Vivian Pierre Bersch** pelo apoio e incentivo dados no início do projeto.

À pesquisadora **Ângela Maria Vicente Tavares** pelos ensinamentos sobre experimentação animal.

À professora **Norma Marroni** e sua equipe do laboratório de fisiologia digestiva, em especial ao amigo biólogo **Nélson Alexandre Kretzmann Filho** pelo auxílio fundamental na realização da dosagem de MPO e TNF- α .

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da UFRGS, especialmente à secretária Sr^a. **Estela Maris Araripe**, pela atenção e profissionalismo.

Ao professor Dr. **Carlos Otávio Corso** pelas contribuições essenciais ao início do projeto.

Ao Dr. **Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho** pelas dicas e orientações quanto à aquisição dos materiais para o experimento.

À Dr^a. **Ana Maria M. Coelho** da Universidade de São Paulo, pela documentação enviada sobre a técnica cirúrgica para indução da pancreatite.

Ao Dr. **Guilherme Mazzini** pela ajuda na documentação fotográfica e filmagem do experimento.

Ao técnico de laboratório **Jéferson Beck da Silva** pelo cuidado e atenção com o armazenamento das amostras.

Ao professor Dr. **Luiz Rohde** pelos seus ensinamentos e estímulos ao meu aperfeiçoamento profissional.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exposição do duodeno _____	45
Figura 2 - Visualização do ducto bílio-pancreático _____	45
Figura 3 - Canulação do ducto bílio-pancreático _____	46
Figura 4 - Infusão de tauracolato de sódio ou soro fisiológico após clipagem do ducto bílio-pancreático junto ao hilo hepático _____	46
Figura 5 - Fechamento da duodenotomia com ponto em “X” _____	47
Figura 6 - Punção da veia jugular, após dissecação, para infusão endovenosa de cloreto de gadolínio ou soro fisiológico _____	47
Figura 7 - Punção cardíaca / eutanásia _____	48
Figura 8 - Ressecção do pâncreas _____	49
Figura 9 - Lavagem do pulmão com EDTA 10% _____	50
Figura 10 - Acondicionamento em papel alumínio antes da congelação em nitrogênio líquido _____	50
Figura 11 - Duodeno, pâncreas e baço _____	50
Figura 12 - Inflamação aguda do parênquima pancreático _____	54
Figura 13 - Esteatonecrose _____	55
Figura 14 - Edema intra-alveolar _____	55
Figura 15 - Hemorragia intra-alveolar _____	56
Figura 16 - Infiltrado neutrofílico _____	56
Figura 17 - Dosagem da amilase _____	62
Figura 18 - Dosagem do TNF- α _____	63
Figura 19 - Dosagem da atividade da mieloperoxidase pulmonar _____	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos experimentais de pancreatite aguda_____	29
Tabela 2 - Grupos experimentais _____	43
Tabela 3 - Animais excluídos _____	51
Tabela 4 - Critérios de análise histológica para o pâncreas _____	53
Tabela 5 - Variáveis descritivas _____	61
Tabela 6 - Análise bioquímica (Média±DP) _____	61
Tabela 7 - Achados histopatológicos – tecido pancreático - mediana (min-máx)_	65
Tabela 8 - Achados histopatológicos - tecido pulmonar – mediana (min-máx)___	65

LISTA DE ABREVIATURAS

BPM	-	Batimentos cardíacos por minuto
CCK	-	Colecistoquinina
CPER	-	Colangiopancreatografia endoscópica retrógrada
DMO	-	Disfunção de múltiplos órgãos
DTPA	-	Ácido dietilenotriaminopentacético
ECA	-	Enzima conversora da angiotensina
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	-	Estados Unidos da América
HE	-	Hematoxilina e eosina
ICAM-1	-	Molécula de adesão intercelular-1
IL	-	Interleucina
IV	-	Intravenoso
LPS	-	Lipopolissacarídeos
MPO	-	Mieloperoxidase
NF$\kappa$$\beta$	-	Fator nuclear kappa beta
PA	-	Pancreatite aguda
PAF	-	Fator ativador plaquetário
PaO₂	-	Pressão parcial de O ₂ arterial
PAR-2	-	Receptor ativado por protease-2
PMN	-	Polimorfonucleares
PSTI	-	Inibidor da secreção pancreática de tripsina
RPM	-	Rotações por minuto
SARA	-	Síndrome da angústia respiratória do adulto
SC	-	Subcutâneo
SIRS	-	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SPSS	-	Statistical package for the social sciences
TAP	-	Peptídeo de ativação do tripsinogênio
TC	-	Tomografia computadorizada
TGO	-	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	-	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF-α	-	Fator de necrose tumoral - alfa
UTI	-	Unidade de tratamento intensivo
VPM	-	Ventilações por minuto
SF	-	Grupo controle com solução fisiológica
GD	-	Grupo controle com cloreto de gadolínio
TS	-	Grupo com PA induzida por tauracolato de sódio
TSGD	-	Grupo com PA por tauracolato e tratamento com gadolínio
GDTS	-	Grupo com PA por tauracolato e pré-tratamento com gadolínio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
SUMÁRIO	XII
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DA LITERATURA	17
FISIOPATOLOGIA NA PANCREATITE AGUDA	17
MODELOS EXPERIMENTAIS DE PANCREATITE AGUDA	23
SIRS E AS CÉLULAS DE KUPFFER	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA	34
OBJETIVOS	38
GERAIS	38
ESPECÍFICOS	38
ABSTRACT	39
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
MÉTODOS	42
AMOSTRA	42
GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
INDUÇÃO DA PANCREATITE AGUDA	43
MORTE DOS ANIMAIS	48
COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	49
CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	51
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	51
ANÁLISE BIOQUÍMICA	57
ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
ÉTICA	59
FINANCIAMENTO	59
RESULTADOS	60
DOSAGEM SÉRICA DE AMILASE	62
DOSAGEM SÉRICA DE TNF-α	63
MIELOPEROXIDASE PULMONAR	64
ANÁLISE HISTOLÓGICA	65
DISCUSSÃO	66

DO MODELO EXPERIMENTAL ESCOLHIDO.....	66
DOS RESULTADOS E SUA INTERPRETAÇÃO.....	67
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
<i>Effects of Gadolinium Chloride on the Treatment of Experimental Acute Pancreatitis Sodium Taurocholate-Induced in Rats</i>	75

INTRODUÇÃO

PANCREATITE AGUDA – CONCEITOS E RELEVÂNCIA CLÍNICA

É um processo inflamatório agudo do pâncreas que se apresenta com dor abdominal associada ao aumento de enzimas pancreáticas no sangue e na urina ^(1;2). Nas formas graves, pode envolver tecidos peripancreáticos, atingir órgãos distantes e causar a morte⁽³⁾.

Setenta a oitenta por cento das vezes é secundária ou à litíase biliar ou ao abuso de álcool ^(1;3-7). No Rio Grande do Sul, a etiologia biliar é a mais freqüente. Em estudo realizado em 2001, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a etiologia biliar esteve presente em 78,4% dos pacientes⁽⁸⁾.

Segundo a classificação de Atlanta (1992), a pancreatite aguda é denominada grave quando houver falência de órgãos e/ou complicações locais (pseudocisto, abscesso e necrose pancreática) ou a presença de sinais de mau prognóstico como critérios de Ranson ≥ 3 ou APACHE II ≥ 8 ^(1;8-11). A necrose pancreática é definida como áreas focais ou difusas de parênquima pancreático não viável tipicamente associado com esteatonecrose dos tecidos gordurosos peripancreáticos. O abscesso pancreático é uma coleção circunscrita de pus contendo pouca necrose pancreática. O pseudocisto é uma coleção de suco pancreático envolvida por uma parede de tecido fibroso ou de granulação^(2;11).

A maioria dos casos, sob o ponto de vista fisiopatológico, se apresenta como pancreatite edematosa (80-85%), que é autolimitada, porém em 15% a 20% pode sobrevir a forma necro-hemorrágica ⁽¹⁻³⁾. A mortalidade na pancreatite necro-

hemorrágica é em torno de 10% a 30%, dependendo da ocorrência de necrose infectada e de insuficiência orgânica^(2;3;7).

Outro importante fator no aumento da mortalidade é a insuficiência de órgãos que pode incluir a presença de choque (pressão arterial sistólica abaixo de 90 mmHg), insuficiência pulmonar ($\text{PaO}_2 < 60$ mmHg), insuficiência renal (creatinina sérica > 2 mg/dL após re-hidratação), sangramento digestivo (> 500 mL de perda sangüínea em 24 horas)^(1;11), coagulopatia (plaquetas $\leq 100.000/\text{mm}^3$, fibrinogênio $< 1,0$ g/L e produtos da degradação da fibrina > 80 $\mu\text{g/mL}$) e distúrbios metabólicos (cálcio sérico $< 7,5$ mg/dL), como definidos nos critérios de Atlanta⁽¹²⁾. É mais comum nos casos de pancreatite necro-hemorrágica (50%) do que nos casos de pancreatite edematosa (5-10%)⁽¹¹⁾.

A mortalidade na pancreatite necro-hemorrágica sem disfunção de órgãos é próxima a 0%, quando há apenas uma disfunção orgânica é menos de 10%, porém a taxa de óbito pode alcançar 50% nos casos de disfunção de múltiplos órgãos. A morbimortalidade também está aumentada nos casos de insuficiência orgânica precoce (diagnosticada já na admissão do paciente) e persistente (além de 48-72 horas)⁽¹¹⁾. A resposta inflamatória é independente da etiologia que inicia a ativação das enzimas digestivas e o dano pancreático, mas é, também, responsável diretamente pela morbidade e mortalidade⁽¹⁾.

Até o momento nenhuma terapêutica clínica específica demonstrou diminuição significativa na mortalidade da pancreatite aguda grave^(3;4;13). O tratamento ainda consiste na terapia intensiva focada nos sintomas e nas complicações locais e sistêmicas da pancreatite como dor, infecção, necrose e disfunção de múltiplos órgãos^(14;15). Nas complicações locais estão indicados procedimentos cirúrgicos,

endoscópicos ou radiológicos quando há necroses infectadas, abscessos ou pseudocistos ^(15;16).

Portanto a pesquisa de novas terapêuticas, baseadas no bloqueio da resposta inflamatória sistêmica, de métodos diagnósticos de predição da gravidade, e de procedimentos eficazes de tratamento, torna-se importante na tentativa de diminuir as complicações e a alta morbidade e mortalidade da pancreatite aguda.

REVISÃO DA LITERATURA

FISIOPATOLOGIA NA PANCREATITE AGUDA

A teoria da ativação prematura de enzimas digestivas dentro das células acinares levando à autodigestão do pâncreas foi postulada por Chiari em 1896⁽¹⁵⁾ e é ainda amplamente aceita como sendo o evento primordial da pancreatite aguda⁽⁴⁾. Iniciado este processo, a sua evolução pode ser dividida em quatro fases: *dano celular/acinar; inflamação pancreática local; resposta inflamatória sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos; e necrose pancreática infectada*⁽¹⁵⁾.

Dano Celular/Acinar

Sob condições normais, as enzimas digestivas são sintetizadas e secretadas pelas células acinares como pró-enzimas inativas chamadas zimogênios. A ativação destas inicia no duodeno quando a enzima enteroquinase ativa o tripsinogênio^(1;15). Este se torna tripsina através da clivagem de uma cadeia curta de peptídeos chamada peptídeo de ativação do tripsinogênio (TAP)⁽¹⁾. A tripsina é uma enzima crítica no processo da pancreatite por promover a sua própria ativação e a ativação de outras enzimas digestivas incluindo quimotripsinogênio, pró-carboxipeptidase e pró-elastase^(1;13;15).

Existem diversos mecanismos protetores intracelulares que evitam o surgimento da pancreatite aguda⁽⁴⁾, incluindo a síntese de tripsina a partir de zimogênios inativados, compartimentalização e vacuolização dos zimogênios, síntese de um inibidor específico da tripsina (inibidor da secreção pancreática de tripsina – PSTI ou SPINK1), controle intracelular do cálcio, entre outros^(1;2). Quando falha um ou mais

destes mecanismos protetores a cascata de ativação das enzimas digestivas é iniciada (1;2).

Estudos experimentais sugerem que a ativação da enzima ATPase apical, a redução do pH, hidrolases e a ruptura do citoesqueleto podem ser responsáveis pela ativação prematura do tripsinogênio^(4;15). Três elementos chaves potenciais para esta ativação são o cálcio, a enzima catepsina B e ativação precoce de NFκβ, um importante fator de transcrição que controla a expressão de citocinas inflamatórias^(5;15).

A ativação intracelular de enzimas digestivas requer acidificação dos compartimentos celulares⁽⁴⁾ que acontece através da ATPase vacuolar sendo que os inibidores desta ATPase evitam a ativação das enzimas digestivas⁽¹³⁾.

O cálcio intracelular é um importante mediador de dano e morte celular e está envolvido na ativação de enzimas digestivas intracelulares e na ativação da resposta inflamatória quando ocorrem elevações anormais do seu nível citosólico^(13;15).

A catepsina B é uma hidrolase lisossomal intracelular que pode clivar o peptídeo ativo do tripsinogênio e ativá-lo. Isto pode acontecer teoricamente se ocorrer uma co-localização intracelular de catepsina B com tripsinogênio em lisossomos vizinhos mediando a ativação sob certas condições como, por exemplo, a presença de pH ácido^(4;15;17;18).

Além da ativação das enzimas digestivas, a tripsina pode participar na regulação do processo inflamatório particularmente em duas situações: a) na clivagem e ativação do receptor ativado por protease (PAR-2), que reduz o dano pancreático pela atenuação dos sinais pró-inflamatórios que ocorrem dentro da célula acinar⁽¹³⁾ e b) na regulação da ICAM-1, uma molécula de adesão endotelial necessária para o transporte de leucócitos do espaço intravascular para os tecidos inflamados apresentando maior expressão no pâncreas e nos pulmões. No tecido pulmonar a sua expressão pode ser ainda mais intensa e estar associada ao aumento do infiltrado leucocitário neste órgão.

No pâncreas provoca a diminuição da perfusão microvascular pelo bloqueio ao fluxo sanguíneo mediado pelo acúmulo de leucócitos resultando em isquemia e necrose pancreática⁽¹³⁾.

Portanto, a tripsina pode ter dupla função: em quantidades pequenas pode induzir uma resposta protetora através do PAR-2, enquanto que em quantidades maiores desencadeia a cascata inflamatória da pancreatite⁽¹³⁾.

Uma vez que ocorra a ativação inapropriada do tripsinogênio e os seus níveis excedam os do inibidor pancreático da secreção de tripsina, o processo de auto-ativação não cessará e provocará a ativação de outros zimogênios e de pancreatite aguda⁽⁴⁾.

As opções de tratamento nesta fase restringem-se a eliminação, do possível fator causal, quando for identificado: álcool, obstrução, isquemia, infecção viral, drogas (inibidores da ECA, estrogênios, corticóides, diuréticos tiazídicos e azatioprina, entre outras), hiperlipidemia ou hipercalcemia, etc. Muitas estratégias terapêuticas foram testadas em modelos experimentais e em humanos, porém até o momento nenhuma mostrou benefício significativo. Além disso, o tratamento na fase inicial da pancreatite só poderá ser administrado, de forma profilática, a pacientes susceptíveis ao desenvolvimento desta doença como, por exemplo, aqueles submetidos a exames eletivos de CPER (colangiopancreatografia endoscópica retrógrada), hiperparatireoidismo primário e pancreatite hereditária, pois a grande maioria dos pacientes tem o diagnóstico feito após o quadro clínico e com a resposta inflamatória em evolução^(14;15).

Inflamação Pancreática Local

Os eventos iniciais responsáveis pelo início da inflamação pancreática ainda não são conhecidos. A teoria mais difundida é que um dano ou ruptura do ácino

pancreático permite o extravasamento de enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina e elastase) que iniciam um processo de autodigestão que resulta na ativação local do sistema imunológico (células dendríticas, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais)⁽⁶⁾. No parênquima, as enzimas ativadas iniciam um processo de autodigestão e de inflamação aguda da glândula que leva a ruptura de tecidos e de membranas celulares causando edema, dano microvascular, hemorragia e necrose⁽⁷⁾.

A resposta inflamatória desencadeada é mediada por citocinas que podem agir localmente, através da atração, ativação e seqüestro de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) dentro do parênquima, agravando a inflamação pancreática; e sistemicamente, aumentando a permeabilidade capilar, promovendo a adesão leucocitária e extravasamento de líquidos para o interstício, podendo levar a disfunção orgânica^(15;19).

Em resposta ao dano tecidual local, $\text{NF}\kappa\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, interleucina-1, IL-6, IL-8 e fator de ativação plaquetária (PAF) são liberados^(6;15). Esta fase torna-se mais complexa devido à resposta anti-inflamatória que segue os efeitos pró-inflamatórios e que é mediada em parte pela IL-10, IL-2, antagonista do receptor da IL-1, sistema complemento e ativação do PAR-2⁽¹⁵⁾.

Não existe uma terapia aprovada ou baseada em evidências para esta fase inflamatória da pancreatite aguda⁽¹⁵⁾.

Resposta Inflamatória Sistêmica e Disfunção de Múltiplos Órgãos

A gravidade da pancreatite aguda é determinada pela magnitude da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)^(1;20;21).

A SIRS é caracterizada por taquicardia (>90 bpm), taquipnéia (>20 vpm), hipocarbica ($\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg), hiper ou hipotermia (>38°C ou <36°C), leucocitose (>12000 células/ μL ou >10% de formas jovens) ou leucopenia (<4000 células/ μL)⁽¹¹⁾.

A grande maioria dos pacientes desenvolverá a forma leve de pancreatite aguda, não evoluindo para as fases de SIRS e DMO que ocorre em aproximadamente 20-25% dos pacientes sendo que destes 30 a 50% morrerão^(1;22).

Os óbitos decorrentes da pancreatite aguda podem ser divididos em dois grupos: *precoces e tardios*⁽⁴⁾. Cinquenta a 60% das mortes ocorrerão na primeira semana decorrente de uma intensa inflamação do pâncreas e de uma SIRS exagerada que resulta em complicações pulmonares como a SARA (Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto)^(1;4;6;23). A disfunção pulmonar, caracterizada por um infiltrado inflamatório neutrofílico do parênquima, é observada em 50%-70% dos pacientes com pancreatite grave^(23;24). Isto resulta num aumento de permeabilidade endotelial e congestão pulmonar seguido por colapso alveolar, diminuição da complacência pulmonar e insuficiência respiratória⁽¹⁾.

Os que sobrevivem a esta fase muitas vezes desenvolverão extensa necrose do pâncreas e dos tecidos adiposos retroperitoneais. A infecção dos tecidos necróticos, causados, principalmente, por translocação bacteriana, levará a sepse e conseqüentemente a DMO, consistindo no grupo com mortalidade tardia⁽⁴⁾.

Novamente não há, até o momento, terapia aprovada ou baseada em evidências para ser aplicada nesta fase da doença⁽¹⁵⁾.

Necrose Pancreática Infectada

A hemoconcentração, resultante da perda de líquidos para o interstício, e o acúmulo de leucócitos na microcirculação pancreática propiciam o surgimento de um estado de hipofluxo pancreático que pode resultar em necrose do parênquima^(1;13).

A necrose pancreática pode se tornar infectada em 30-70% dos pacientes com pancreatite necro-hemorrágica^(1;15). A extensão da necrose pancreática e

peripancreática parece ser o principal determinante de uma complicação séptica letal subsequente⁽⁷⁾. Sabendo-se que a necrose necessita de tempo para se estabelecer, pode existir uma janela terapêutica na evolução da pancreatite quando uma intervenção adequada pode evitar ou reduzir outras lesões⁽⁷⁾.

Em contraste com as fases anteriores, existe um algoritmo de tratamento definido. Os pacientes são tratados em ambiente de UTI. Na suspeita de necrose infectada deve ser considerada a realização de TC de abdômen com contraste. Na presença de infecção confirmada por bacterioscopia e cultural em punção guiada por ecografia/tomografia a cirurgia é indicada^(9;15;16;25). Deve-se suspeitar de um falso negativo da punção na presença de necrose pancreática não havendo melhora clínica significativa em pacientes tratados por mais de quatro semanas em UTI, e nos casos com disfunção de múltiplos órgãos de forma rápida e progressiva apesar da otimização no tratamento intensivo^(9;15;16;25).

MODELOS EXPERIMENTAIS DE PANCREATITE AGUDA

A primeira pancreatite experimental foi produzida por Claude Bernard em 1856 através da injeção de bile e óleo de oliva no ducto pancreático canino ⁽²⁶⁾.

Os modelos experimentais na pancreatite aguda surgiram da necessidade de investigar os mecanismos moleculares envolvidos e de testar terapias potenciais ⁽²⁶⁾. A ampla variação do curso e gravidade da doença, a baixa incidência das formas mais graves de pancreatite e a relativa inacessibilidade do tecido pancreático para realização de exames durante o processo inflamatório geram dificuldades para se realizar tais estudos em humanos ^(14;27).

O modelo experimental ideal, teoricamente, deve ser reproduzível, ter etiologia, fisiopatologia e resposta a tratamentos similares a doença em humanos, e ser relativamente de baixo custo ^(5;22;28). Para testar tratamentos potenciais, devem ser preferidos os que induzem pancreatite grave e resposta inflamatória sistêmica porque nessa condição a intervenção terapêutica poderá trazer benefícios clínicos ^(5;22;28).

Existem diversos modelos experimentais de pancreatite aguda que permitem o estudo dos processos fisiopatológicos e testes de medidas terapêuticas ⁽⁵⁾. Nenhum modelo é induzido por agentes etiológicos exatamente como na pancreatite em humanos ⁽⁷⁾. Entre os mais usados estão os descritos a seguir:

Alça Duodenal Fechada

Foi um dos primeiros modelos experimentais desenvolvidos ⁽²⁹⁾. É baseado na teoria do refluxo duodenal e por isso possui pouca relevância clínica ^(5;29). É relativamente simples, econômico e reproduzível ⁽²⁹⁾. Possui diversas variações no método e pode ser utilizado em cães, macacos e ratos ^(5;29).

Ocorre após 6 horas pancreatite edematosa e em 12 horas necro-hemorrágica.

A forma edematosa cura completamente em 7 a 14 dias e a hemorrágica em três meses com seqüelas residuais. A gravidade depende da perfusão da alça fechada e animais que apresentam estase venosa pronunciada ou isquemia intestinal morrem em 2-3 dias^(14;30).

Administração Retrógrada no Canal Bílio-pancreático de Agentes Indutores - Tauracolato de Sódio

A base teórica deste modelo experimental pode ser explicada pela observação feita por Opie, em 1901, que sugeriu haver refluxo biliar para dentro do canal pancreático na vigência de obstrução da papila de Vater (teoria do canal comum), dando início ao processo inflamatório no pâncreas^(31;32).

O modelo experimental com utilização de tauracolato de sódio (sal biliar) injetado retrogradamente pelo ducto bílio-pancreático, padronizado por Aho et al, reproduz muitas características da pancreatite aguda necro-hemorrágica de origem biliar^(14;31-33). As concentrações podem variar de 1% a 6% sendo que a partir de 2,5% já é capaz de induzir pancreatite grave com SIRS^(5;34).

Aho et al sugerem que o efeito detergente do tauracolato em altas concentrações imediatamente rompe a integridade do ducto bílio-pancreático proximal levando ao extravasamento de sais biliares para dentro do interstício, poupando as células acinares localizadas na periferia do sistema ductal⁽²²⁾.

Após a infusão ocorre aparecimento imediato de edema intersticial, seguido de extensa necrose de células acinares e hemorragia durante as primeiras 24 horas. A mortalidade e a gravidade da pancreatite aumentam de acordo com a concentração de tauracolato injetado e a pressão intraductal empregada durante a infusão^(14;31;32).

É um modelo experimental de pancreatite necro-hemorrágica bem estabelecido que induz deficiência em múltiplos órgãos tais como pulmões, rins, fígado, intestinos e cérebro⁽⁵⁾. Pode ser utilizado em coelhos, cães, porcos, ratos e camundongos⁽⁵⁾.

É tecnicamente difícil, apresentando 70 a 100% de mortalidade nas primeiras 24 a 48 horas após a indução, quando utilizado altas concentrações deste sal biliar⁽¹⁴⁾.

Possui relevância clínica e é altamente reprodutível, o que o torna um excelente método de indução de pancreatite^(5,6).

Aplicação Intraperitoneal de Arginina

É um modelo pouco invasivo. A injeção intraperitoneal de arginina, em dose única (250-500 mg/100g de peso corporal), pode induzir pancreatite grave em ratos, coelhos e camundongos^(5,35).

O mecanismo de indução não está totalmente esclarecido, mas a toxicidade no tecido pancreático, provavelmente, é devida à inibição da síntese protéica, ativação de mediadores inflamatórios, produção excessiva de óxido nítrico, radicais livres de oxigênio e peroxidação lipídica^(5,35).

Ocorre pancreatite edematosa em 12 horas e necrose acinar focal em 24 horas após a indução⁽³⁵⁾. As alterações necróticas do tecido pancreático com infiltrado inflamatório atingem extensão máxima em 72 horas. Em sete dias, começa o reparo das lesões e num período aproximado de 14 dias a arquitetura pancreática está restabelecida. Exerce mínimo efeito em outros órgãos como fígado, rins e pulmões⁽⁵⁾. O controle da gravidade da pancreatite pode ser obtido através do ajuste da concentração de arginina injetada e do tempo de exposição⁽⁵⁾. A mortalidade deste tipo de pancreatite é aproximadamente 2,5%⁽³⁵⁾.

Este modelo é criticado pela pouca relevância clínica relacionada à etiologia⁽⁵⁾.

Hiperestimulação Pancreática por Aplicação Intravenosa, Intraperitoneal ou Subcutânea de Ceruleína

A estimulação pancreática excessiva através de secretagogos resulta em pancreatite devido à alta secreção de enzimas digestivas^(5;18). A pancreatite induzida pela ceruleína é histologicamente muito similar às fases iniciais em humanos^(5;18).

Pode ser administrada via injeção intraperitoneal, subcutânea ou infusão intravenosa e permite o estudo *in vitro* através da administração da ceruleína a ácinos ou a células exócrinas isoladas^(5;6).

É efetiva em induzir pancreatite em camundongos, ratos, coelhos, cães e porcos^(5;18). Quando induzida em ratos produz somente pancreatite edematosa e, em camundongos, necro-hemorrágica com lesão pulmonar^(4;14). A necrose acinar desenvolve-se em 7 horas, tornando-se maciça, sem hemorragia, em 12 horas; posteriormente ocorre atrofia e fibrose⁽¹⁸⁾.

É o modelo experimental mais citado na literatura devido a sua alta aplicabilidade, indução rápida, reprodutibilidade e ser pouca invasiva. Todavia, possui fraca relevância clínica⁽⁵⁾. Quando utilizado em ratos não há mortalidade e a pancreatite induzida é auto-limitada, tornando este modelo inadequado para avaliação de testes terapêuticos^(7;14).

Isquemia Pancreática

Existem diversos métodos para alterar a vascularização pancreática em modelos experimentais, incluindo o comprometimento da microcirculação pancreática⁽⁵⁾.

Pode ser realizada pela ligadura da irrigação arterial do pâncreas (tronco celíaco, artéria mesentérica superior, artéria gastroduodenal), ligadura da drenagem venosa (veia esplênica, veias gástricas curtas, veia gastroepiplóica esquerda),

administração de microesferas e choque hemorrágico, produzindo desde pancreatite aguda edematosa até necro-hemorrágica com esteatonecrose⁽³⁶⁾.

A pancreatite induzida por choque hipovolêmico imita a observada após cirurgias prolongadas (cirurgias cardíacas) em humanos^(5;36). Porém não é específico para o pâncreas, o que não é o ideal para estudo de DMO associada com pancreatite⁽⁵⁾.

A principal desvantagem destes modelos experimentais é o trauma cirúrgico dramático exercido sobre os animais. Além disso, podem ocorrer sangramentos importantes durante o procedimento, necessitam protocolos sofisticados e analgesia contínua. São factíveis apenas em animais maiores como cães e porcos, sendo o custo elevado^(5;36).

Ligadura do Canal Pancreático

A indução da pancreatite é consequência da ligadura do ducto bílio-pancreático ao nível do duodeno, podendo também ser realizada outra ligadura ao nível do hilo hepático^(5;37).

Reproduz pancreatite edematosa similar à pancreatite aguda biliar observada em humanos. Não induz pancreatite grave e permite a observação dos animais por mais de duas semanas, apresentando taxa de mortalidade quase nula⁽³⁷⁾.

Induz pancreatite edematosa com inflamação periductal sem necroses extensas ou complicações infecciosas em ratos⁽³⁷⁾.

É relativamente fácil de conduzir e reproduzir⁽⁵⁾, mas não é adequado para avaliação de medidas terapêuticas pela baixa taxa de mortalidade⁽¹⁴⁾.

Dieta Deficiente em Colina Suplementada com Etionina por 3 a 5 Semanas

Consiste na administração de uma dieta deficiente em colina suplementada com DL-etionina 0,5%. É o método menos invasivo entre todos os modelos experimentais, não requer injeções ou manipulação cirúrgica⁽⁵⁾.

Pode ser induzida em ratos, camundongos, gatos e cães, mas freqüentemente usa-se camundongos fêmeas⁽⁵⁾. O mecanismo de indução parece ser devido à toxicidade exercida pela etionina diretamente no pâncreas por interferir na síntese do RNA, proteínas e metabolismo fosfolipídico sendo que a deficiência em colina é sinérgica, aumentando a gravidade^(5;17). Reproduz algumas alterações morfológicas e fisiológicas das formas mais graves da doença em humanos^(19;24). O acúmulo intracelular de grânulos de zimogênio é uma das primeiras anormalidades morfológicas e precede o aparecimento dos vacúolos intracelulares⁽¹⁷⁾.

Produz desde pancreatite edematosa até necro-hemorrágica caracterizada por vacuolização com início em 24 a 33 horas, necrose acinar com desenvolvimento em 48 horas, infiltração leucocitária em 54 horas, esteatonecrose e hemorragia em 60 horas após o início da dieta⁽¹⁷⁾. A indução lenta da pancreatite, entre dois e três dias, possibilita a observação da evolução da doença^(5;6).

Não é um modelo ideal, apesar de conveniente, pois afeta diretamente outros órgãos incluindo o fígado e o cérebro, o que limita o estudo de disfunção de múltiplos órgãos associada com pancreatite^(5;14;17).

Sua efetividade é maior quando utilizado em camundongos fêmeas jovens^(6;14;17). Este fator também constitui em limitação devido ao tamanho pequeno do animal e a dificuldade de manipulação cirúrgica ou a intervenções terapêuticas envolvendo coleta de amostras sanguíneas e administrações intravenosas^(5;7;14;22). Outra desvantagem deste modelo deve-se a doença extremamente variável, dependente da ingesta e do peso do animal. Apresenta mortalidade de 80-100% após 2-8 dias⁽¹⁴⁾.

Tabela 1. Modelos Experimentais de Pancreatite Aguda

Modelo Experimental	Animais	Vantagens	Desvantagens
Dieta deficiente em colina	Camundongos	Não invasiva Praticidade Alta taxa de mortalidade	Pouca relevância clínica Efeitos tóxicos não específicos para o pâncreas Restrito a pequenos animais
Arginina	Ratos, camundongos, coelhos	Não invasiva, Indução rápida Facilidade em controlar a gravidade Toxicidade específica para o pâncreas	Pouca relevância clínica
Ceruleína	Camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos	Não invasiva Indução rápida Fácil controle da gravidade Facilmente reprodutível Aplicável em diferentes animais Similaridade nas alterações histológicas Disponibilidade de estudos <i>in vitro</i> Possibilidade de mimetizar infecções bacterianas	Pouca relevância clínica
Isquemia Pancreática	Ratos, gatos, cães e porcos	Clinicamente relevante para pancreatite aguda induzida pós-cirurgia e trombose de veia porta/esplênica	Técnicas cirúrgicas sofisticadas Trauma cirúrgico dramático Dano não específico ao pâncreas Alto custo Analgesia contínua
Alça duodenal fechada	Ratos, cães e macacos	Etiologia orientada (pancreatite induzida por refluxo duodenal)	Requer técnicas cirúrgicas elaboradas Exerce certo grau de trauma cirúrgico aos animais
Obstrução ductal	Ratos, coelhos, camundongos	Relevância clínica para pancreatite induzida por obstrução causada por cálculo biliar Compatibilidade com outras estimulações/estresse (CCK, ceruleína, secretina, ou isquemia)	Dificuldade em comparações entre espécies devido à gravidade da pancreatite ser variável em diferentes animais
Infusão ductal	Ratos, camundongos, coelhos, cães e porcos	Flexibilidade no estudo da etiologia da PA e controle da gravidade Similaridade com a PA clínica em alguns modelos Altamente aplicável em muitas espécies Compatibilidade com outras substâncias como tripsina, LPS e ceruleína	Presença da pressão hidrostática que por si só induz PA

Adaptado de Chan et al. ⁽⁵⁾

SIRS E AS CÉLULAS DE KUPFFER

As células de Kupffer, descritas em 1876 por Karl Wilhelm Kupffer⁽³⁸⁾, são macrófagos especializados residentes no fígado, localizados no lúmen dos sinusóides e ancorados ao endotélio por processos citoplasmáticos. Sabe-se que dentro do parênquima hepático possuem heterogeneidade de tamanho e função dependendo de sua localização: as células de Kupffer da região peri-portal são maiores e possuem alta atividade fagocítica quando comparadas com as que se localizam nas regiões perivenulares⁽³⁹⁾. O fígado, portanto, possui a maior população de macrófagos teciduais fixos^(19-21;24).

O dano hepático, mediado por citocinas inflamatórias produzidas pelas células de Kupffer, é um marcador de resposta inflamatória sistêmica durante a pancreatite aguda, e é um importante indicador prognóstico^(20;21). O papel do fígado na pancreatite aguda é amplificar a resposta inflamatória sistêmica através das células de Kupffer^(19;23;40).

Estas células, quando ativadas são capazes de liberar grande quantidade de citocinas na circulação sistêmica, amplificando a resposta inflamatória⁽²⁰⁾. A lesão pulmonar que segue a SIRS, durante a pancreatite aguda, pode ser atribuída, em grande parte, à ação das células de Kupffer^(24;41). A elastase pancreática induz a produção de fator de necrose tumoral (TNF) nas células de Kupffer via ativação do NFκβ constituindo a principal fonte de TNF-α^(6;20;21;42;43).

O TNF-α parece ser a principal citocina na progressão sistêmica da inflamação desencadeada pela pancreatite e é um determinante de mortalidade em animais de laboratório^(2;20;43).

A lesão pulmonar associada à pancreatite grave não pode ser distinguida da SARA causada por outras condições como sepse, politraumatismos e queimaduras graves^(24;43). Parece resultar de dano endotelial local associado com a geração de radicais livres de oxigênio pelos neutrófilos.

A adesão de neutrófilos ao endotélio dos capilares pulmonares é o passo inicial do processo de dano pulmonar. Outros fatores como a fosfolipase A2, o fator de ativação plaquetária, as enzimas proteolíticas pancreáticas liberadas na circulação, a produção de citocinas e a ativação do sistema complemento também contribuem para o desenvolvimento da inflamação pulmonar^(23;43).

A infiltração neutrofílica tem uma função importante no desenvolvimento da pancreatite aguda e no dano pulmonar associado⁽²³⁾. Foi demonstrado em camundongos deficientes em moléculas de adesão nas células endoteliais, como a ICAM-1, ou tratados com um anticorpo anti-neutrófilos, atenuação da pancreatite e de danos em outros órgãos⁽⁴⁰⁾. Esta proteção incompleta sugere existir outras rotas que levam à resposta inflamatória que devem ser atingidas para poder haver um bloqueio total da inflamação sistêmica⁽⁴⁰⁾.

Closa et al concluíram que o dano pulmonar que segue a pancreatite aguda grave está diretamente relacionado à passagem, através do fígado, de substâncias (citocinas) liberadas na circulação porta pelo pâncreas inflamado. O estudo consistiu da comparação de ratos submetidos à derivação porto-cava antes da indução de pancreatite aguda, com ratos não submetidos ao shunt, evidenciando menor dano pulmonar no primeiro grupo^(23;43;44).

Gloor et al mostraram que o bloqueio da célula de Kupffer reduz os níveis de citocinas sistêmicas e hepáticas, além de, também, reduzir o dano pulmonar e a

mortalidade (52% vs 86%, $p < 0,001$ – em camundongos) na pancreatite hemorrágica experimental utilizando gadolínio^(19;42).

O gadolínio, classificado como um lantanídeo terra rara é utilizado clinicamente como contraste para exames de ressonância magnética sob o complexo Gd-DTPA, mas quando administrado endovenosamente sob a forma de cloreto de gadolínio é uma droga experimental que é capaz de bloquear especificamente as funções das células de Kupffer além de, possivelmente, não exercer efeitos sobre outros macrófagos como os residentes no peritônio^(19;24;45-47). Esta ação torna possível o estudo das funções das células de Kupffer⁽⁴⁸⁾.

Esta substância é captada de forma altamente seletiva pelas células de Kupffer nas quais provoca profunda depressão na capacidade fagocítica, levando eventualmente à morte destas células^(19;40;43). Isto resulta numa inibição quase total da resposta hepática usual a uma variedade de toxinas^(19;42) sem induzir dano hepático significativo⁽⁴³⁾. Segundo Gloor, os efeitos sistêmicos do bloqueio das células de Kupffer utilizando gadolínio não são influenciados pelo grau de pancreatite, tendo em vista que esta substância não age na inflamação pancreática⁽⁴³⁾.

Na forma grave da pancreatite aguda, o cloreto de gadolínio, como pré-tratamento, foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade em camundongos, mas este efeito benéfico permanece confuso tendo em vista que também ocorre diminuição das concentrações de IL-10, uma citocina que tem um potente efeito anti-inflamatório que inibe a liberação de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) sendo protetora na evolução da pancreatite aguda^(2;19;24;40).

O mecanismo de ação do gadolínio não está totalmente esclarecido. Muitos pesquisadores sugerem que suas ações impedem a fagocitose pelas células de Kupffer, bloqueiam os canais de cálcio, induzem apoptose nos macrófagos alveolares e

inibem a expressão do gene do TNF por modulação de eventos iniciais na cascata das citocinas⁽²¹⁾.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- (1) Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. *Clin Lab Med* 2005 Mar;25(1):17-37.
- (2) Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet* 2008 Jan 12;371(9607):143-52.
- (3) Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 2007 Sep;133(3):1056.
- (4) Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005;5(2-3):132-44.
- (5) Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007 Jan;34(1):1-14.
- (6) Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 2005 Dec;24 Suppl 1:45-51.
- (7) Rattner DW. Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;219:6-9.
- (8) Osvaldt AB, Viero P, Borges da Costa MS, Wendt LR, Bersch VP, Rohde L. Evaluation of Ranson, Glasgow, APACHE-II, and APACHE-O criteria to predict severity in acute biliary pancreatitis. *Int Surg* 2001 Jul;86(3):158-61.
- (9) Heinrich S, Schafer M, Rousson V, Clavien PA. Evidence-based treatment of acute pancreatitis: a look at established paradigms. *Ann Surg* 2006 Feb;243(2):154-68.
- (10) Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? *Int J Colorectal Dis* 2000 Jun;15(3):127-35.
- (11) Forsmark CE, Baillie J. AGA Institute technical review on acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007 May;132(5):2022-44.
- (12) Bradley EL, III. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993 May;128(5):586-90.
- (13) Pandol SJ. Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005 Sep;21(5):538-43.
- (14) Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? *Int J Colorectal Dis* 2000 Jun;15(3):127-35.
- (15) Felderbauer P, Muller C, Bulut K, Belyaev O, Schmitz F, Uhl W, et al. Pathophysiology and treatment of acute pancreatitis: new therapeutic targets-a ray of hope? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005 Dec;97(6):342-50.

- (16) Werner J, Feuerbach S, Uhl W, Buchler MW. Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut* 2005 Mar;54(3):426-36.
- (17) Niederau C, Luthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Methodology and standards. Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:40-54.
- (18) Willemer S, Elsasser HP, Adler G. Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:29-39.
- (19) Gloor B, Todd KE, Lane JS, Lewis MP, Reber HA. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J Gastrointest Surg* 1998 Sep;2(5):430-5.
- (20) Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR, Jr., et al. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003 Jan;7(1):20-5.
- (21) Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002 May;6(3):474-80.
- (22) 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 Jan;215(1):44-56.
- (23) Hoyos S, Granell S, Heredia N, Bulbena O, Closa D, Fernandez-Cruz L. Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery* 2005 Feb;137(2):186-91.
- (24) 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 Nov;80(1):110-4.
- (25) Nathens AB, Curtis JR, Beale RJ, Cook DJ, Moreno RP, Romand JA, et al. Management of the critically ill patient with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2004 Dec;32(12):2524-36.
- (26) Buchler M, Friess H, Uhl W, Beger HG. Clinical relevance of experimental acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:85-8.
- (27) Widdison AL, Alvarez C, Reber HA. The low-pressure duct perfusion model of acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:55-61.
- (28) Azima B, Kao RL, Youngberg G, Williams D, Browder W. A new animal model of reversible acute pancreatitis. *J Surg Res* 1996 Jul 1;63(2):419-24.
- (29) Weber A, Friess H, Sill U, Buchler M. The closed duodenal loop technique. *Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:24-8.

- (30) Wendt LR, Nagel F, Costa MSB, Edelweiss MIA, Rohde L. Effects of octreotide in experimental acute pancreatitis. *ABCD - Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* 13, 37-42. 2000.
- (31) 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.
- (32) Senninger N. Bile-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:68-73.
- (33) Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res* 1983;15(1):28-36.
- (34) Tonini KC, Speranzini MB, Neves MM, Rodrigues C, Goldenberg S. Pancreatite aguda necro-hemorrágica induzida por tauracolato de sódio. Estudo das lesões anatomopatológicas em ratos. *Acta Cir Bras* 1993;8(3):96-103.
- (35) Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Sari R, Gog C, Lonovics J, Takacs T, et al. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004 Jul 15;10(14):2003-9.
- (36) Waldner H. Vascular mechanisms to induce acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:62-7.
- (37) Festugato M, Coelho CP, Fiedler G, Machado FP, Goncalves MC, Bassani FR, et al. Hyperbaric oxygen therapy effects on tissue lesions in acute pancreatitis. Experimental study in rats. *JOP* 2008;9(3):275-82.
- (38) Wake K. Karl Wilhelm Kupffer and his contributions to modern hepatology. *Comp Hepatol* 2004 Jan 14;3 Suppl 1:S2.
- (39) Lee CM, Yeoh GC, Olynyk JK. Differential effects of gadolinium chloride on Kupffer cells in vivo and in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 Mar;36(3):481-8.
- (40) Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F, Hadengue A, Morel P, Frossard JL. Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006 Feb 28;12(8):1219-24.
- (41) Liu HB, Cui NQ, Li DH, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol* 2006 Jan 21;12(3):403-7.
- (42) Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, et al. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2000 Nov;21(4):414-20.
- (43) Folch E, Prats N, Hotter G, Lopez S, Gelpi E, Rosello-Catafau J, et al. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000 Aug;45(8):1535-44.

- (44) Closa D, Bardaji M, Hotter G, Prats N, Gelpi E, Fernandez-Cruz L, et al. Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol* 1996 Jan;270(1 Pt 1):G6-13.
- (45) Zhang JX, Wu HS, Wang H, Zhang JH, Wang Y, Zheng QC. Protection against hepatic ischemia/reperfusion injury via downregulation of toll-like receptor 2 expression by inhibition of Kupffer cell function. *World J Gastroenterol* 2005 Jul 28;11(28):4423-6.
- (46) Okutan H, Savas C, Ozguner IF, Yonden Z, Eren VC, Delibas N. Lung injury after aortic occlusion-reperfusion in rats: the role of gadolinium chloride. *Tohoku J Exp Med* 2004 Aug;203(4):267-73.
- (47) Weinmann HJ, Brasch RC, Press WR, Wesbey GE. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *AJR Am J Roentgenol* 1984 Mar;142(3):619-24.
- (48) Granado M, Martin AI, Priego T, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium administration prevents lipopolysaccharide-induced decrease in liver insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 gene expression. *J Endocrinol* 2006 Mar;188(3):503-11.

OBJETIVOS

GERAIS

Avaliar os efeitos do bloqueio seletivo das células de Kupffer com o cloreto de gadolínio antes e após a indução de pancreatite aguda pelo tauracolato de sódio, através do nível de TNF- α , da inflamação pancreática local e da lesão pulmonar.

ESPECÍFICOS

- a. Avaliação e comparação do dano pulmonar pela medida da mieloperoxidase (MPO) e análise histológica;
- b. Avaliação e comparação da gravidade da pancreatite, entre os diferentes grupos do experimento, por análise histológica;
- c. Comparação, entre os grupos, das dosagens de transaminases (transaminase glutâmico oxalacética-TGO, transaminase glutâmico pirúvica-TGP), amilase e TNF- α .

ABSTRACT

BACKGROUND: Some experimental studies suggest that the use of a selective blocker of Kupffer cells, gadolinium chloride as a pre-treatment, used 24 hours before the induction of pancreatitis, results in the decrease of mortality and associated lung injury.

OBJECTIVE: To evaluate the effects of the use of gadolinium chloride treatment before and after induction of acute pancreatitis with sodium taurocholate 3% in rats.

METHODS: Wistar rats were divided into 5 groups: **group SF** - control with saline intra-ductal and IV, **group TS** - with AP control induced by sodium tauracholate to 3% and saline IV; **group GD** - control with saline intra-ductal and gadolinium chloride IV; **group GDTS** - pre-treatment with GD (24 hours before the induction of AP) and **group TSGD** - treatment with GD (1h after the induction of AP). Euthanasia was carried out in 24 hours after the induction of pancreatitis. Analysis was made in serum amylase, transaminases and TNF- α ; determination of the MPO activity in lung tissue, lung and pancreatic histology. **RESULTS:** The number of dead animals before the end of the experiment was significantly higher in group TSGD ($p = 0,046$). The scores of pancreatitis and lung damage were higher in the groups who used sodium tauracholate compared to groups with intra-ductal infusion of saline solution. There were no differences in other variables studied in comparison between groups TS; GDTS and TSGD. **CONCLUSIONS:** In this study the benefits with the use of gadolinium chloride as a prophylactic and therapeutic drug were not demonstrated.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos experimentais sugerem que o uso de um bloqueador seletivo das células de Kupffer, cloreto de gadolínio, utilizado como pré-tratamento, 24 horas antes da indução da pancreatite, resulta na diminuição de mortalidade e da lesão pulmonar associada. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos do uso de cloreto de gadolínio como pré-tratamento e tratamento em um modelo experimental de pancreatite em ratos induzida por tauracolato de sódio a 3%. **MÉTODOS:** Ratos Wistar foram divididos em 5 grupos: **grupo SF** – controle com solução fisiológica intra-ductal e IV; **grupo TS** – controle com PA induzida por tauracolato de sódio a 3% e solução fisiológica a 0,9% IV; **grupo GD** – controle com SF intra-ductal e cloreto de gadolínio IV; **grupo GDTS** – pré-tratamento com GD (24h antes da indução da PA) e **grupo TSGD** – tratamento com GD (1h após a indução da PA). Após a indução da pancreatite foi realizado eutanásia em 24h. Dosagem sérica de amilase, transaminases e TNF- α ; dosagem da atividade da MPO no tecido pulmonar; histologia pancreática e pulmonar. **RESULTADOS:** O número de animais mortos antes do término previsto do experimento foi significativamente maior no **grupo TSGD** ($p=0,046$). Os escores de pancreatite e de dano pulmonar foram mais elevados nos grupos que utilizaram tauracolato em comparação aos grupos com infusão intra-ductal de solução salina. Não houve diferenças nas demais variáveis estudadas na comparação entre os **grupos TS; GDTS e TSGD**. **CONCLUSÕES:** Não foram demonstrados benefícios com o uso de cloreto de gadolínio de forma profilática e terapêutica.

INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda é um processo inflamatório que se apresenta com dor abdominal associada ao aumento de enzimas pancreáticas no sangue e na urina ^(1;2). Com alguma freqüência evolui com inflamação de tecidos peripancreáticos podendo às vezes atingir órgãos distantes e causar a morte ⁽³⁾.

A falta de tratamento específico para a pancreatite aguda com eficácia comprovada e baseada em evidências tem estimulado a pesquisa, em modelos experimentais, de medicações que ajam no bloqueio da resposta inflamatória sistêmica desencadeada por esta doença.

A inflamação pancreática local leva à produção de citocinas que são responsáveis diretamente pela morbidade e mortalidade da pancreatite aguda ⁽⁴⁻⁶⁾. Estudos experimentais mostraram o envolvimento do fígado (mais precisamente das células de Kupffer) no processo de amplificação da resposta inflamatória sistêmica através da ativação destas células pelas citocinas produzidas pelo pâncreas inflamado ^(4;6-12).

O bloqueio destas células por cloreto de gadolínio, dado de forma profilática, mostrou-se promissor em alguns estudos experimentais em que foi observado diminuição de mortalidade e de dano pulmonar ^(4;6;13). Por outro lado, os efeitos desta droga não estão totalmente esclarecidos, além de ter sido utilizada apenas como pré-tratamento ^(4;6;7;10;12-15).

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do uso de gadolínio antes e após a indução da pancreatite utilizando um modelo experimental com infusão de tauracolato de sódio no ducto bílio-pancreático.

MÉTODOS

AMOSTRA

Foram utilizados para o estudo 65 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albicuns*), machos, adultos, com peso entre 233 g e 450 g.

No projeto piloto, realizado para o treinamento da canulação do ducto pancreático e dissecação venosa, foram utilizados 10 animais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo **SF** – Canulação e infusão de solução salina no ducto bílio-pancreático e administração de solução salina IV (24 horas antes da infusão ductal e 1 hora após). (n = 5 animais).

Grupo **TS** – Indução de pancreatite com tauracolato e administração de solução salina IV (24 horas antes da infusão ductal e 1 hora após). (n = 9 animais).

Grupo **GD** – Administração IV de solução salina 24 horas antes da canulação e infusão de solução salina no ducto bílio-pancreático seguido de administração de cloreto de gadolínio IV 1 hora após a infusão ductal. (n = 5 animais).

Grupo **GDTS** - Administração de cloreto de gadolínio IV 24 horas antes da indução de pancreatite com tauracolato seguido, 1 hora após, de infusão IV de solução salina. (n = 9 animais).

Grupo **TSGD** – Administração IV de solução salina 24 horas antes da indução de pancreatite com tauracolato seguida, 1 hora após, de infusão IV de cloreto de gadolínio. (n = 9 animais)

Foi realizado a reposição dos animais que não sobreviveram até a realização da eutanásia para manter a distribuição estabelecida de 5 animais nos grupos SF e GD, e 9 animais nos demais grupos.

TABELA 2: Grupos Experimentais

Grupo	Ratos	IV 24h antes	Canulação ducto bílio-pancreático	IV 1h depois	Eutanásia 24h após
SF	6	SF 0,9%	SF 0,9%	SF 0,9%	6 ratos
TS	16	SF 0,9%	Tauracolato de Sódio a 3%	SF 0,9%	12 ratos
GD	5	Gadolinio	SF 0,9%	SF 0,9%	5 ratos
GDTS	16	Gadolinio	Tauracolato de Sódio a 3%	SF 0,9%	9 ratos
TSGD	22	SF 0,9%	Tauracolato de Sódio a 3%	Gadolinio	10 ratos

INDUÇÃO DA PANCREATITE AGUDA

O modelo experimental utilizado para indução da pancreatite aguda foi o de infusão intraductal de tauracolato de sódio a 3% (*Taurocholic acid sodium salt hydrate – synthesized from cholic acid -T4009-, Sigma-Aldrich, Nova Zelândia*)⁽¹⁶⁾.

Conforme o protocolo utilizado, os animais, após jejum de 6 horas, foram anestesiados com cloridrato de ketamina 50 mg/kg (*Dopalen®*, *Sespo Indústria e Comércio LTDA, Jacareí, São Paulo*), juntamente com cloridrato de xilazina 20 mg/kg (*Anasedan®*, *Sespo Indústria e Comércio LTDA, Jacareí, São Paulo*) intraperitoneal. O procedimento cirúrgico foi o seguinte: laparotomia mediana com comprimento aproximado de 2 cm seguida de exteriorização do duodeno com identificação do pâncreas e do ducto bílio-pancreático na face mesentérica da alça duodenal (figuras 1

e 2). Após foi realizada uma duodenotomia puntiforme na borda antimesentérica no lado oposto à abertura do ducto utilizando agulha 25x7 para obter-se a canulação transpapilar do ducto bílio-pancreático com cateter nº 24 G (*cateter intravascular periférico Jelco – Teflon, Medex Medical LTD, Inglaterra*) por aproximadamente 5 mm, evitando danificar o pâncreas (figura 3) ⁽¹⁷⁾. Após foi realizado a oclusão temporária do ducto bílio-pancreático ao nível do hilo hepático com clampe vascular delicado que permaneceu até o término da infusão (figura 4). A indução da pancreatite foi realizada por infusão retrógrada de 0,5mL de taurocolato de sódio a 3% através de bomba de infusão numa velocidade de 0,1mL/min ⁽¹⁶⁾.

Após a remoção do clampe, o cateter foi retirado, o orifício duodenal suturado com fio monofilamentar agulhado de polipropileno 7-0 (Premilene[®], B-BRAUN Medical, Bogotá, Colômbia) (figura 5) e o abdômen fechado em plano único com fio monofilamentar de nylon 4-0 (Shalon[®], Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás, Brasil).

Nos grupos **SF** e **GD** os procedimentos foram realizados de forma idêntica com exceção da injeção de tauracolato que foi substituído por solução salina.

No grupo pré-tratamento (**GDTS**) foi realizado a infusão de cloreto de gadolínio a 4% (*gadolinium (III) chloride anhydrous, Aldrich*) na dose de 10mg/kg⁽¹³⁾ (aproximadamente 0,250 mL) pela veia jugular 24 horas antes da indução da pancreatite (figura 6). No grupo tratamento (**TSGD**), o cloreto de gadolínio foi infundido 1 hora após a indução. O controle foi realizado com a infusão de solução salina.

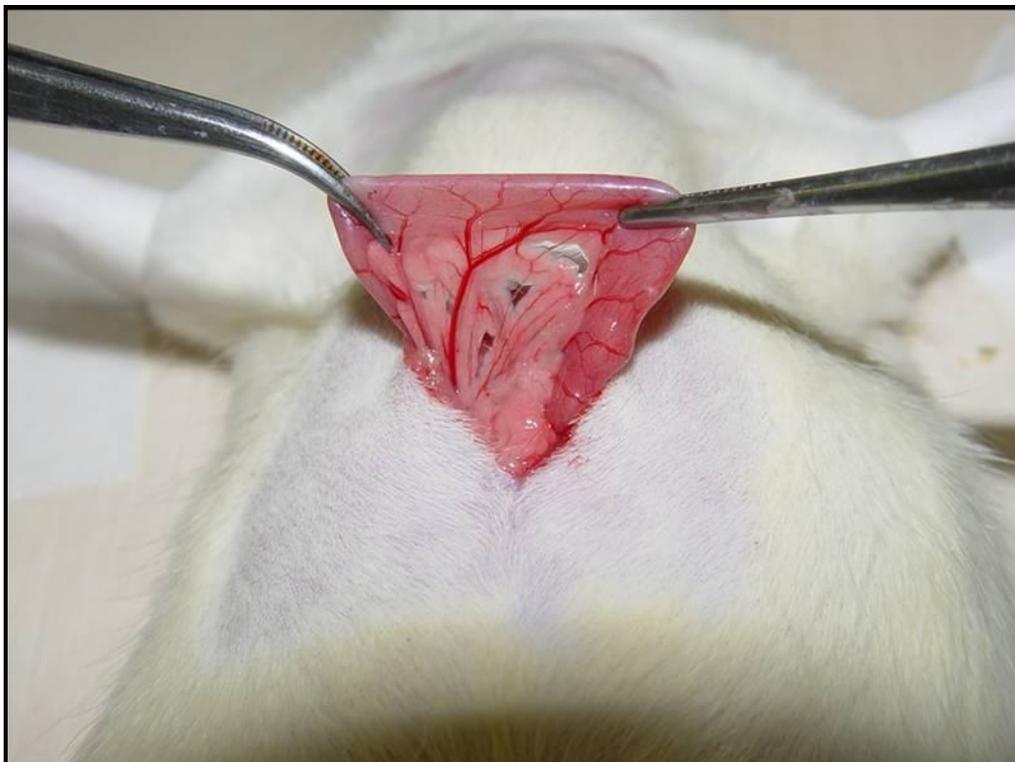


Figura 1. Exposição do duodeno

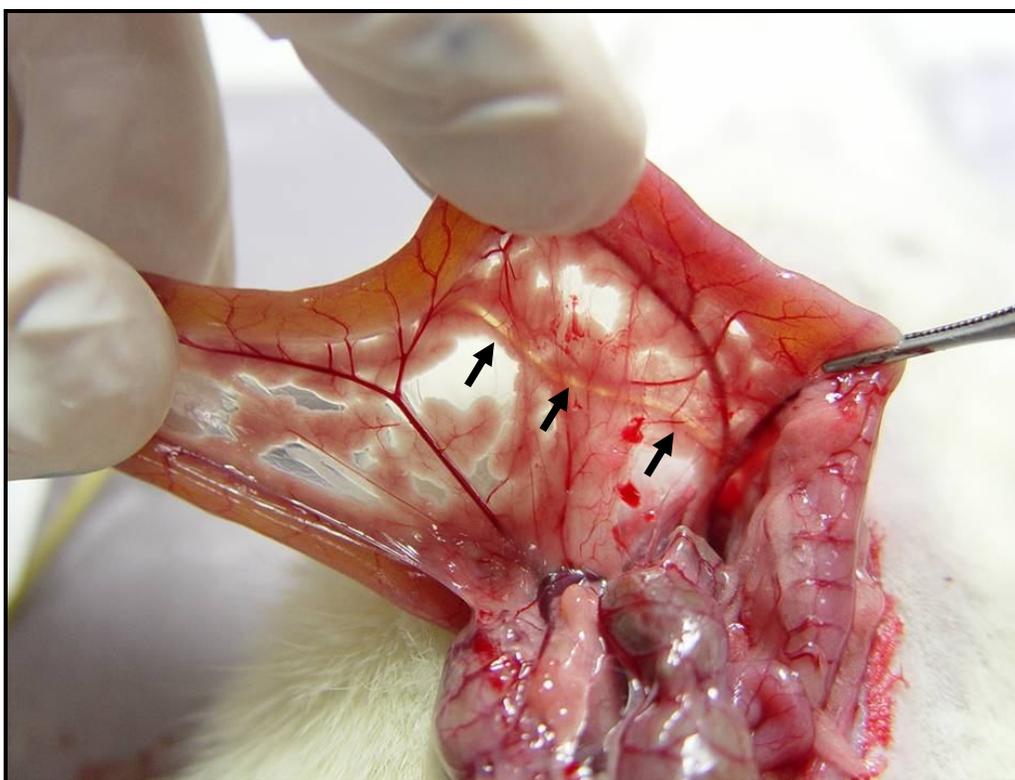


Figura 2. Visualização do ducto bílio-pancreático (setas)

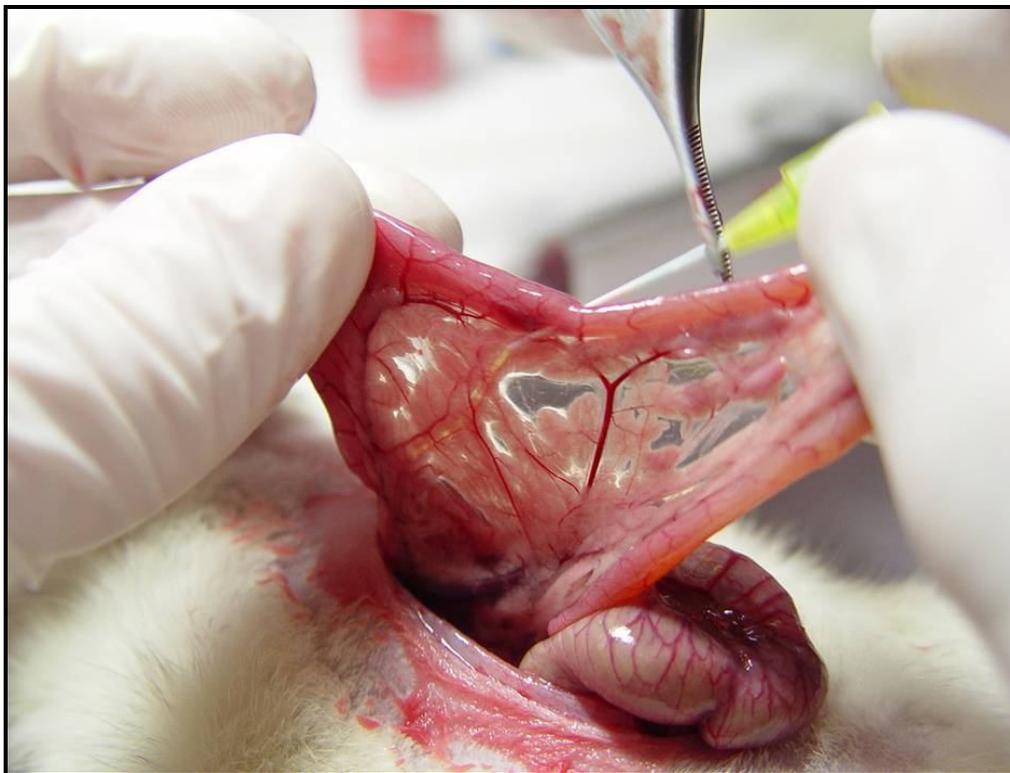


Figura 3. Canulação do ducto bílio-pancreático através do duodeno



Figura 4. Infusão de tauracolato após clipagem do ducto bílio-pancreático junto ao hilo hepático



Figura 5. Fechamento da duodenotomia com ponto em “X”



Figura 6. Punção da veia jugular, após dissecção, para infusão endovenosa de cloreto de gadolínio ou soro fisiológico

MORTE DOS ANIMAIS

A eutanásia ocorreu 24 horas após o início do experimento por exsanguinação. Foram anestesiados conforme previamente descrito. Após a cavidade torácica foi aberta por esternotomia mediana, coletado 3 a 4 mL de sangue por punção cardíaca e removidos os pulmões através de dissecação (figura 7).

Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta por extensão da incisão anterior, após a tração do cólon e do duodeno, o pâncreas foi exposto sendo removido na sua totalidade e dissecado cuidadosamente, retirando-se todo o tecido adiposo e linfonodos adjacentes (figura 8).

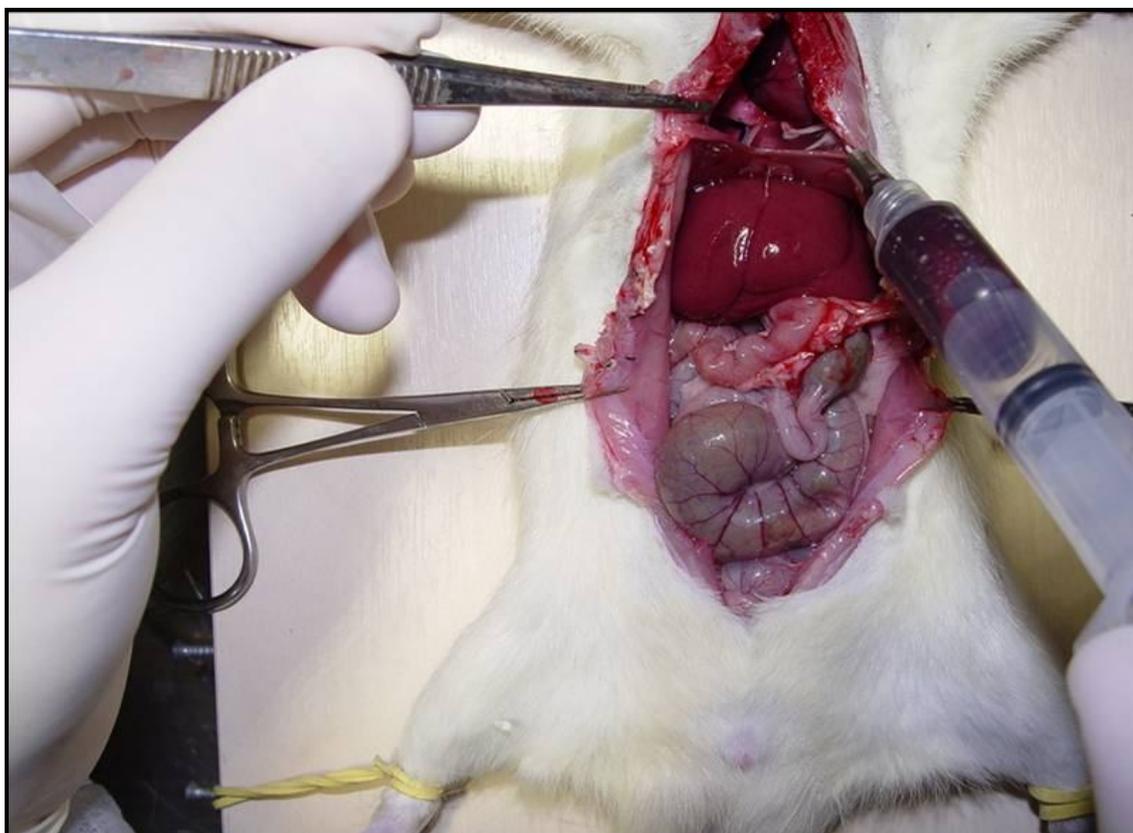


Figura 7. Punção cardíaca / eutanásia

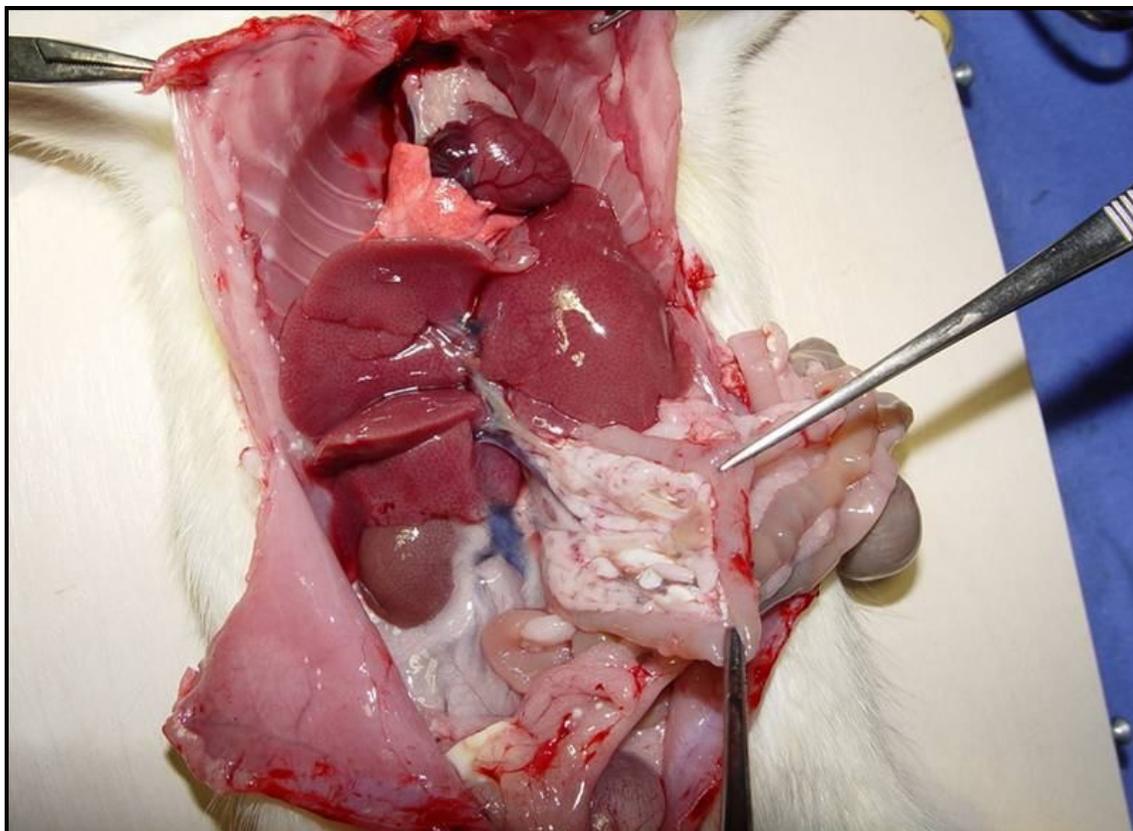


Figura 8. Ressecção do pâncreas

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

O sangue foi coletado através de punção cardíaca (figura 7) e acondicionado em tubos plásticos (*Vacurette 4mL, Greiner Bio-one Brasil, Americana, São Paulo*) que foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos sendo o soro separado e estocado a -80°C .

O pulmão direito foi coletado, para análise da atividade da mieloperoxidase, por meio de dissecação delicada seguida de lavagem do mesmo com solução salina com EDTA a 10% (figura 9), acondicionamento em papel alumínio (figura 10), congelação em nitrogênio líquido e, após, armazenado a -80°C .



Figuras 9 e 10. Lavagem do pulmão com EDTA 10% e acondicionamento em papel alumínio antes da congelação em nitrogênio líquido

Os tecidos pancreático (figura 11) e pulmonar (pulmão esquerdo) foram conservados em formalina tamponada a 10% por 24 horas.



Figura 11. Duodeno, pâncreas e baço

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os animais cujo pâncreas foi danificado durante a canulação do ducto pancreático ou quando houve perfuração do ducto durante este procedimento; cujo óbito ocorreu antes do término previsto do experimento (24 horas); ou quando as amostras de sangue estavam hemolisadas.

TABELA 3: Animais Excluídos

Nº. de Ratos por Grupo	Durante o Procedimento ou Óbitos antes de 24h	Submetidos à Eutanásia	Amostras Hemolisadas	Analisados
SF = 6	0	6 (100%)	1 (16%)	5
TS= 16	4 (25%)	12 (75%)	3 (25%)	9
GD= 5	0	5 (100%)	0	5
GDTS= 16	7 (43,7%)	9 (56,2%)	0	9
TSGD= 22	12 (54,5%)	10 (45,4%)	1 (10%)	9

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Pâncreas

Após dissecação das peças, as mesmas foram processadas e realizados cortes de 0,5 micra sendo que cada lâmina foi composta por duas amostras coradas pela técnica de hematoxilina-eosina.

As lâminas foram numeradas aleatoriamente de maneira a não permitir sua identificação e examinados por patologista experiente em patologia experimental pancreática, utilizando uma adaptação da escala padronizada de Schmidt et al⁽¹⁷⁾.

Foram pesquisados edema, necrose acinar, hemorragia no parênquima e no tecido gorduroso, necrose gordurosa e infiltrado leucocitário intralobular e perivascular, cuja graduação permitia a avaliação de um escore total de 28 pontos, conforme a tabela 4⁽¹⁷⁾.

Pulmão

A análise microscópica do tecido pulmonar foi realizada de forma semelhante, sendo avaliados: edema intra-alveolar, hemorragia intra-alveolar e infiltrado neutrofílico. Os escores seguiram a seguinte graduação: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-intenso; 4-muito intenso.

Tabela 4: Critérios de Análise Histológica para o Pâncreas.

Análise Histológica – Pâncreas			
I- Edema:			
0	Ausente		
1	Expansão focal / difusa do septo interlobar		
2	Expansão focal / difusa do septo interlobular		
3	Expansão focal / difusa do septo interacinar		
4	Expansão focal / difusa do septo intercelular		
II – Necrose Acinar			
0	Ausente		
1	Focal / difusa de 1 - 4 células necróticas		
2	Focal / difusa de 5-10 células necróticas		
3	Focal / difusa de 11 - 16 células necróticas (foco de necrose confluyente)		
4	Focal / difusa de mais de 16 células necróticas (extensa necrose confluyente)		
III- Hemorragia			
	Parenq.	Gordura	IV- Infiltrado intralobular
0	Ausente		0 0-1 leucócito intralobular
1	1-2 focos		1 Foco (1ou +) com 2 – 10 leucócitos intralobular
2	3-4 focos		2 Foco (1ou +) com 11 – 20 leucócitos intralobular
3	5-6 focos		3 Foco (1ou +) com 21 – 30 leucócitos intralobular
4	7 ou mais focos		4 Foco (1ou +) com mais de 30 leucócitos intralobular (micro abscesso focal ou confluyente)
V – Necrose gordurosa		VI – Infiltrado perivascular	
0	Ausente		0 0-1 leucócito perivascular
1	1-2 focos		1 Foco (1ou +) com 2 – 10 leucócitos perivascular
2	3-4 focos		2 Foco (1ou +) com 11 – 20 leucócitos perivascular
3	5-6 focos		3 Foco (1ou +) com 21 – 30 leucócitos perivascular
4	7 ou mais focos		4 Foco (1ou +) com mais de 30 leucócitos perivascular (micro abscesso focal ou confluyente)

CRITÉRIOS HISTOPATOLÓGICOS

Pâncreas

Edema: presença de líquido seroso ou alargamento dos espaços intercelulares, interacinares, interlobulares e interlobares.

Necrose Acinar: considerada como alterações degenerativas citoplasmáticas com a presença de núcleos degenerados, ou em cariólise.

Necrose gordurosa / esteatonecrose: necrose do tecido adiposo, de cor azulada, associada ou não a hemorragia no tecido peripancreático ou intrapancreático.

Hemorragia: presença de eritrócitos fora do leito vascular.

Infiltrado perivascular: presença de polimorfonucleares e mononucleares adjacentes a vasos sanguíneos ou em diapedese, permeando a parede vascular.

Infiltrado intralobular: presença de polimorfonucleares e mononucleares dentro do parênquima lobular.

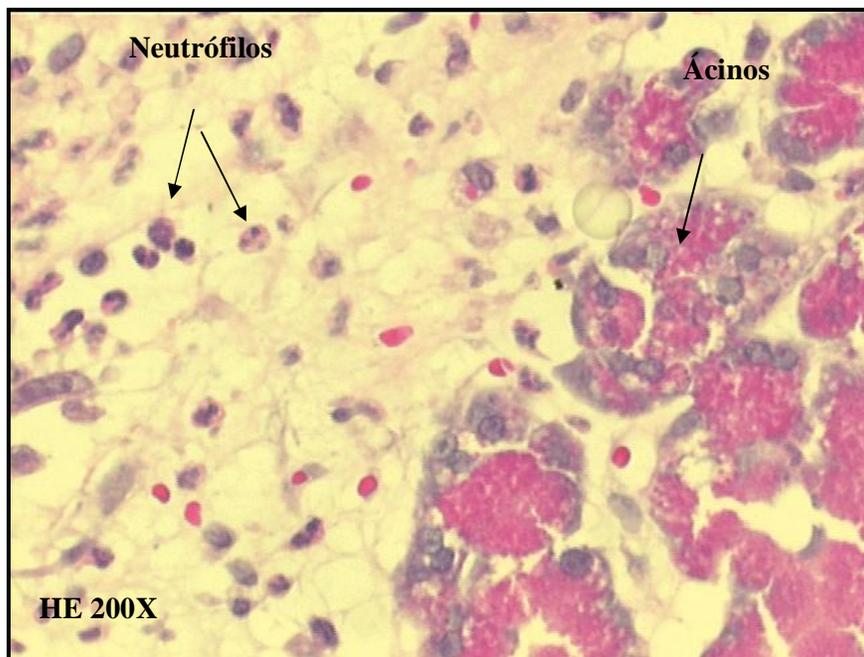


Figura 12. Inflamação aguda do parênquima pancreático

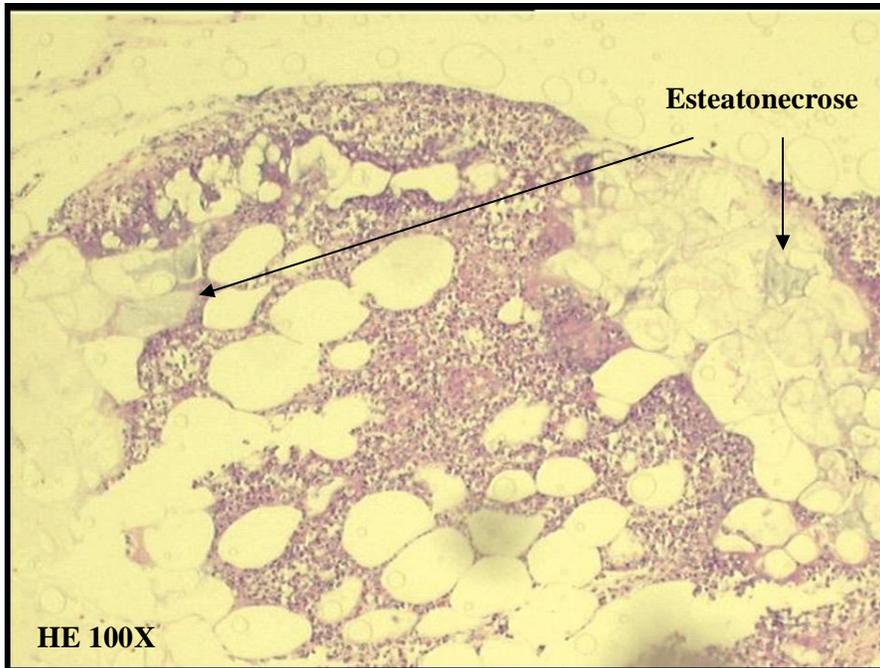


Figura 13. Esteatonecrose

Pulmão:

Edema intra-alveolar: presença de líquido seroso dentro do alvéolo pulmonar

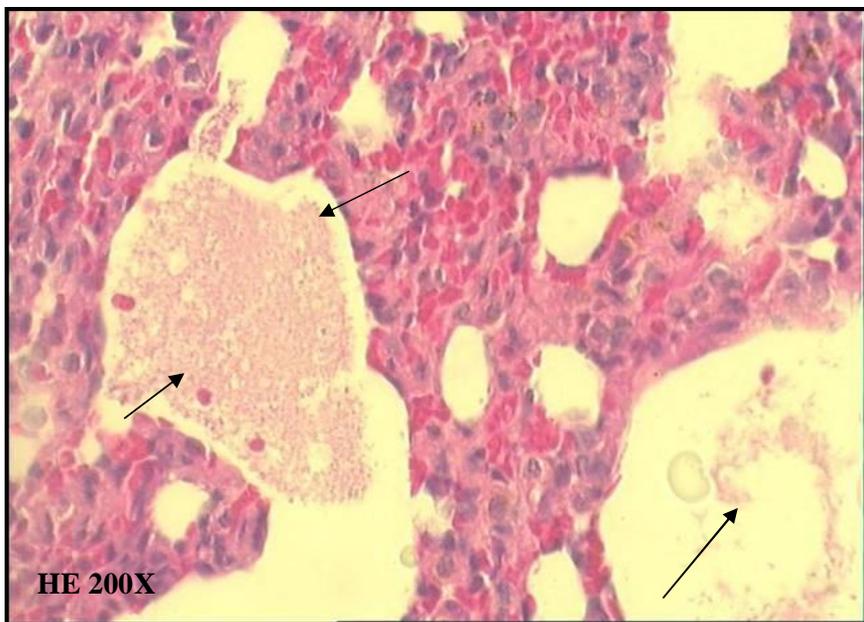


Figura 14. Edema intra-alveolar

Hemorragia intra-alveolar: presença de eritrócitos dentro dos alvéolos.

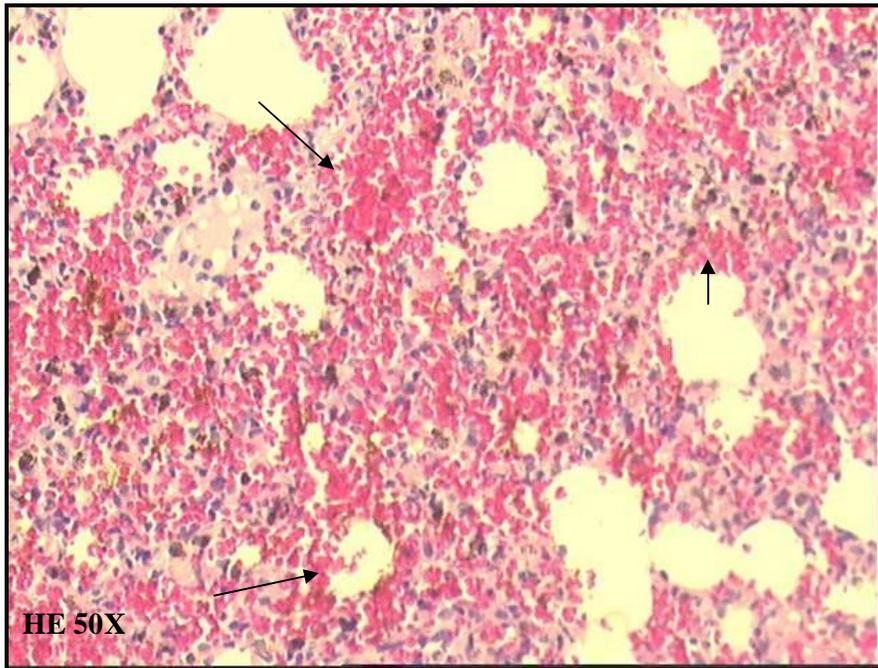


Figura 15. Hemorragia intra-alveolar

Infiltrado neutrofílico pulmonar: presença de polimorfonucleares nos septos alveolares ou dentro dos alvéolos.

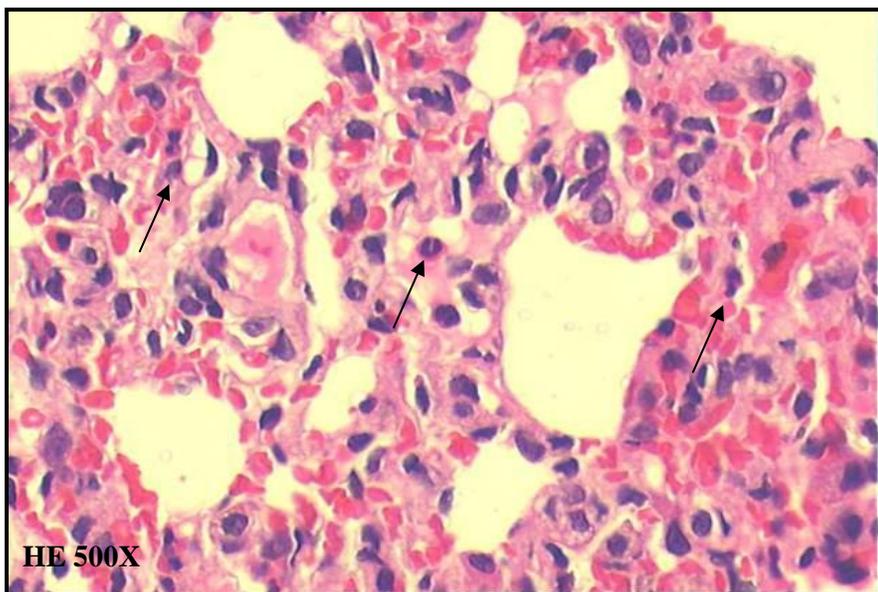


Figura 16. Infiltrado neutrofílico

ANÁLISE BIOQUÍMICA

Amilase

Foram realizadas dosagens em duplicata utilizando teste enzimático colorimétrico (*Cobas, Roche, Indianápolis, USA*) – (valores de referência baseados em ratos sem pancreatite: 530-810 U/L)⁽¹⁸⁾.

AST/TGO, ALT/TGP

Foram realizadas dosagens em duplicata utilizando Teste UV (*Cobas, Roche, Indianápolis, USA*). Valores de referência: TGO ($81 \pm 11,7$ U/L); TGP ($51 \pm 12,3$ U/L).

Mieloperoxidase Pulmonar

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como indicativo da atividade neutrofílica inflamatória no pulmão. As amostras de tecido pulmonar foram armazenadas em nitrogênio líquido. No dia do ensaio, para cada 50 mg de peso do tecido, foram adicionados 500µL de tampão de homogeneização (brometo de hexadeciltrimetilamonio 50mM e tampão fosfato de potássio 0,1M). Os tecidos foram homogeneizados, submetidos ao ultra-som (40Hz) por 15 segundos, congelados e descongelados por três vezes em nitrogênio líquido, e centrifugados a 3000 rpm por 30 min a 4°C. Para a reação da cinética enzimática adicionou-se 140 µL de tampão fosfato de potássio (0,1M), 10 µL de amostra, 10 µL de orto-dianisidina 2% e logo antes da leitura foi adicionado 12µL de H₂O₂ 20mM. A cinética enzimática foi analisada em placa de 96 poços a 450 nm. Os resultados foram expressos em absorvância/min/mg de proteína.

TNF- α

As concentrações de TNF- α nas amostras de soro foram realizadas através do método de ELISA, segundo instruções do fabricante (Kit RAT TNF-alpha, R&D System, EUA), no laboratório de Hepatologia Experimental-Fisiologia do Centro de Pesquisas do HCPA. O limite inferior de detecção do TNF- α para este método foi de 10 pg/mL.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do tamanho amostral foi baseado nos resultados do estudo de Gloor et al ⁽⁷⁾. Para detectar uma diferença significativa entre os grupos controle e os que utilizaram cloreto de gadolínio para análise do TNF- α foi calculado amostra de 9 animais em cada grupo utilizando um nível de significância de 5% e um poder de amostra de 90%. O cálculo para as demais variáveis, mieloperoxidase e graduação histológica pulmonar foram, respectivamente, 4 e 5 ratos por grupo.

As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas percentuais, com comparação entre os grupos pelo teste de qui-quadrado. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média e desvio padrão e as com distribuição assimétrica pela mediana, mínimo e máximo. A representação da distribuição das variáveis amilase, TNF- α e MPO foram apresentadas nos gráficos dotplot (Programa Sigma Plot versão 8.0).

Para a comparação do nível sérico médio de amilase, TGO, TGP, MPO e TNF α nos diferentes grupos foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas de teste post Hoc de Tukey para comparação múltipla.

Para a comparação dos escores histológicos de pancreatite aguda e do dano pulmonar nos diferentes grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e posteriormente foi feita a transformação por postos das variáveis com distribuição assimétrica, sendo

estes postos comparados pelo teste post hoc de Tukey. Foi utilizado poder da amostra 90% e nível significância 5%. Foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 14.0 para análise estatística dos dados.

ÉTICA

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob nº06-259.

FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE) com gasto total de R\$ 8.794,13 para a sua conclusão.

RESULTADOS

Dos 65 animais utilizados no estudo, quatro foram excluídos devido à perfuração do ducto pancreático durante a sua canulação (n=2 / grupos GDTS e TSGD) e óbito durante a anestesia (n=2 / grupos TS e TSGD).

Dos 61 animais restantes, 19 (31,1%) morreram num período de 6 a 12 horas após a indução da pancreatite, e, por isso, não foram utilizados na análise bioquímica e histológica. Estes estavam distribuídos da seguinte forma: 3/15 no grupo TS, 6/15 no grupo GDTS e 10/20 no grupo TSGD.

A análise estatística evidenciou uma perda significativamente maior de animais no grupo TSGD ($p=0,046$). Não houve óbitos antes do tempo determinado para o término do experimento nos grupos controle SF e GD.

Dos 42 animais (68,9%) que sobreviveram até o fim do experimento, cinco amostras sanguíneas estavam hemolisadas e foram excluídas (1/6 no grupo SF, 3/12 no grupo TS, e 1/10 no grupo TSGD).

O total de perdas foi 28/65 (43,07%) animais, 1/6 (16,66%) no grupo SF, 7/16 (43,75%) grupo TS, 0/5 (0%) grupo GD, 7/16 (43,75%) grupo GDTS e 13/22 (59,09%) grupo TSGD.

Tabela 5: Variáveis Descritivas

VARIÁVEIS	SF	TS	GD	GDTS	TSGD	p
PESO (gramas) (Média±DP)	368,3±35,22	335,7±62,18	410,6±23,14*	371,7±46,11	330,4±44,40	0,004
TEMPO DE PROCEDIMENTO (minutos) (Média±DP)	9,6±5,08	12,4±5,01	12±1,00	11,2±3,15	10,5±3,17	0,126
†EXCLUSÕES DURANTE O PROCEDIMENTO n(%)	0 (0%)	1 (6,3%)	0 (0%)	1 (6,3%)	2 (9,1%)	0,902
†ÓBITOS ANTES 24H n(%)	0 (0%)	3 (20%)	0 (0%)	6 (40%)	10 (50%)	0,046
†AMOSTRAS HEMOLISADAS n(%)	1 (16,7%)	3 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	0,404

* $p < 0,05$ comparado ao grupo TS e TSGD. † Teste de Qui-quadrado

Tabela 6: Análise Bioquímica (Média±DP)

VARIÁVEIS	SF	TS	GD	GDTS	TSGD	p
AMILASE (U/L)	4.905,6±2758,8	7.153,6±4460,12	4.527,4±872,49	15.481±10.495,32*	12.424,3±5.641,94	0,009
TGP (U/L)	54,4±14,29	113,4±85,51	107±43,14	105,8±63,47	125,2±75,25	0,448
TGO (U/L)	214,6±69,45	449,3±517,16	310±36,11	425,4±261,32	410,4±142,52	0,636
TNF – α (pg/mL)	15,08±3,74	18,6±1,83	14,32±4,52	17,7±4,44	21,4±3,59*	0,008
MPO (absorvância/min/mg prot)	0,058±0,013†	0,096±0,031	0,074±0,015	0,096±0,017	0,081±0,022	0,019

* $p < 0,05$, comparado com os grupos SF e GD; † $p < 0,05$, comparado com os grupos TS e GDTS.

DOSAGEM SÉRICA DE AMILASE

A confirmação laboratorial de PA foi demonstrada através da dosagem de amilase expressa em U/L. Todos os animais tiveram dosagens pelo menos três vezes o limite superior do valor de referência.

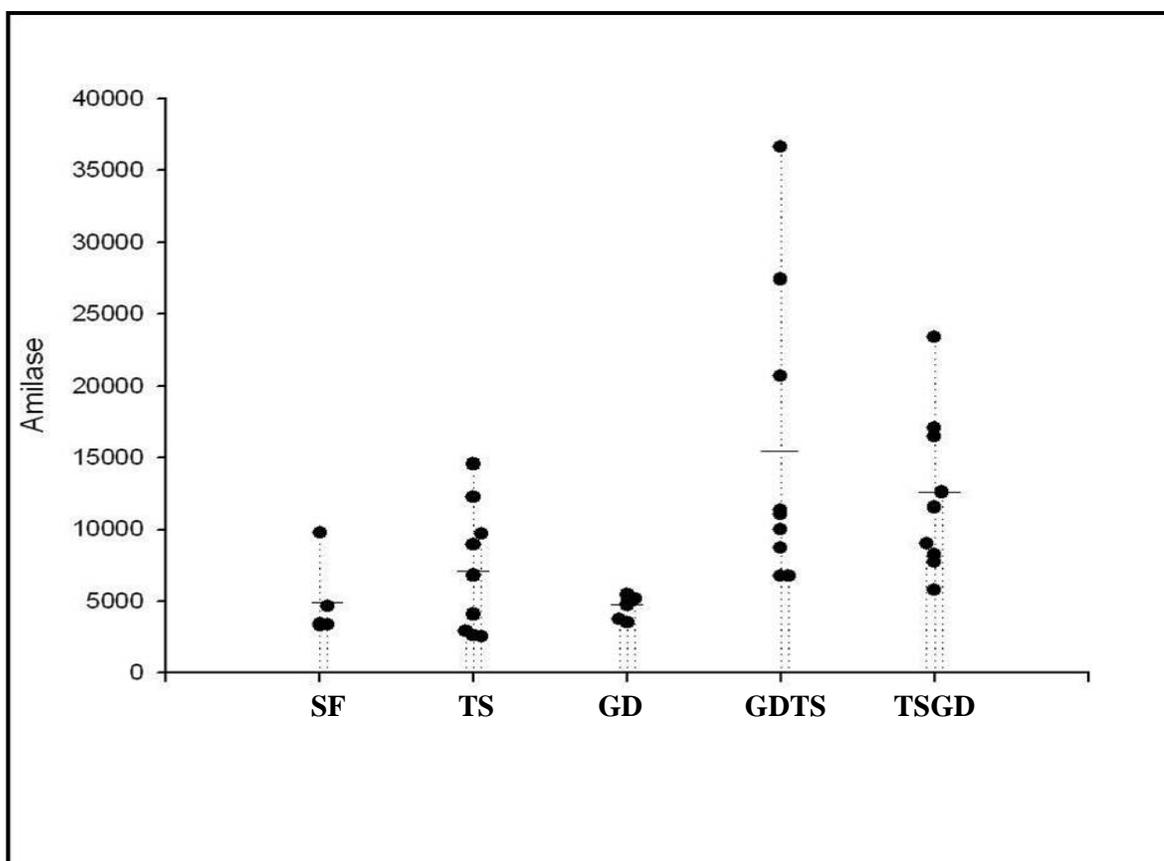


Figura 17. Dosagem da amilase. ($p = 0,009$)

DOSAGEM SÉRICA DE TNF- α

A dosagem do TNF- α foi expressa em pg/mL de proteína.

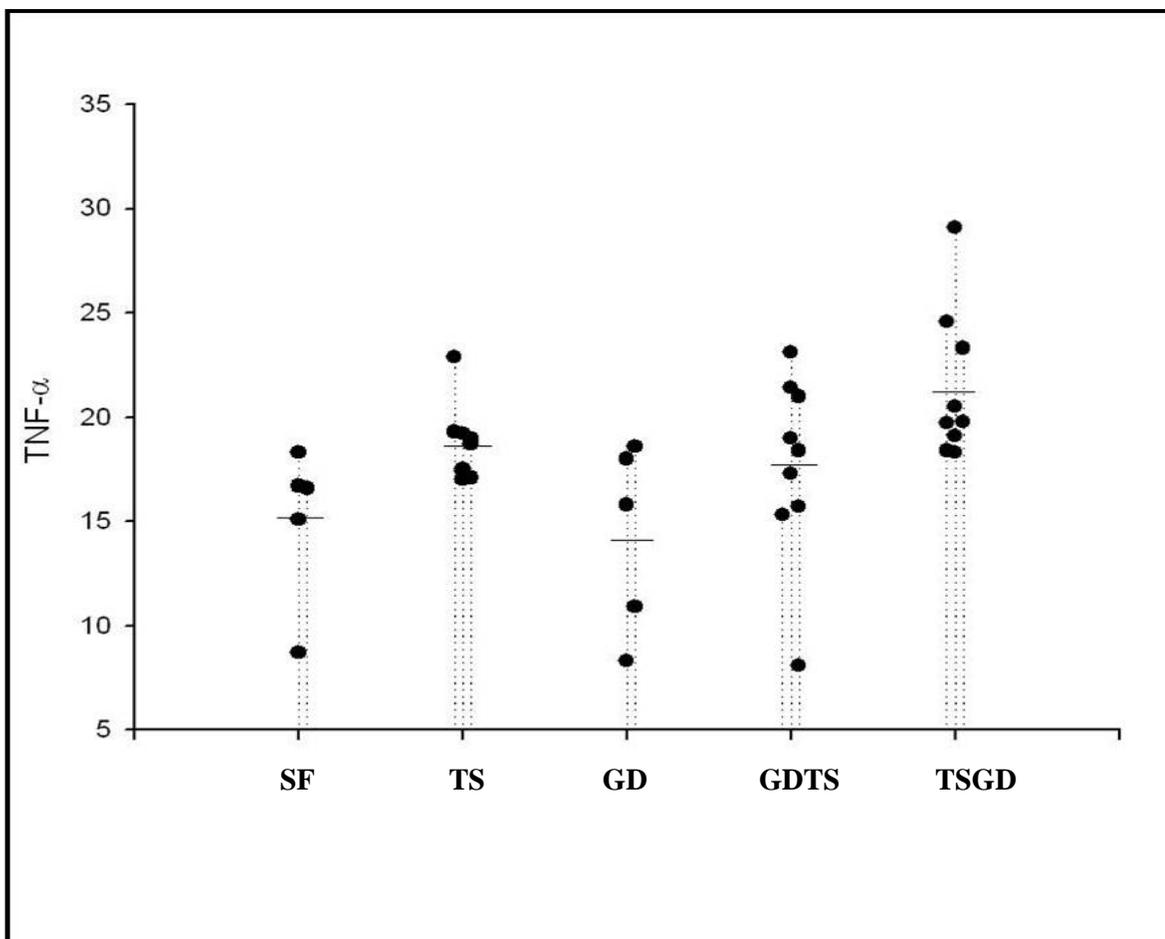


Figura 18. Dosagem do TNF- α . ($p = 0,008$)

MELOPEROXIDASE PULMONAR

A dosagem da atividade da MPO, utilizada para avaliar a infiltração neutrofílica no tecido pulmonar induzida pela pancreatite aguda foi expressa em absorvância/min/mg de proteína.

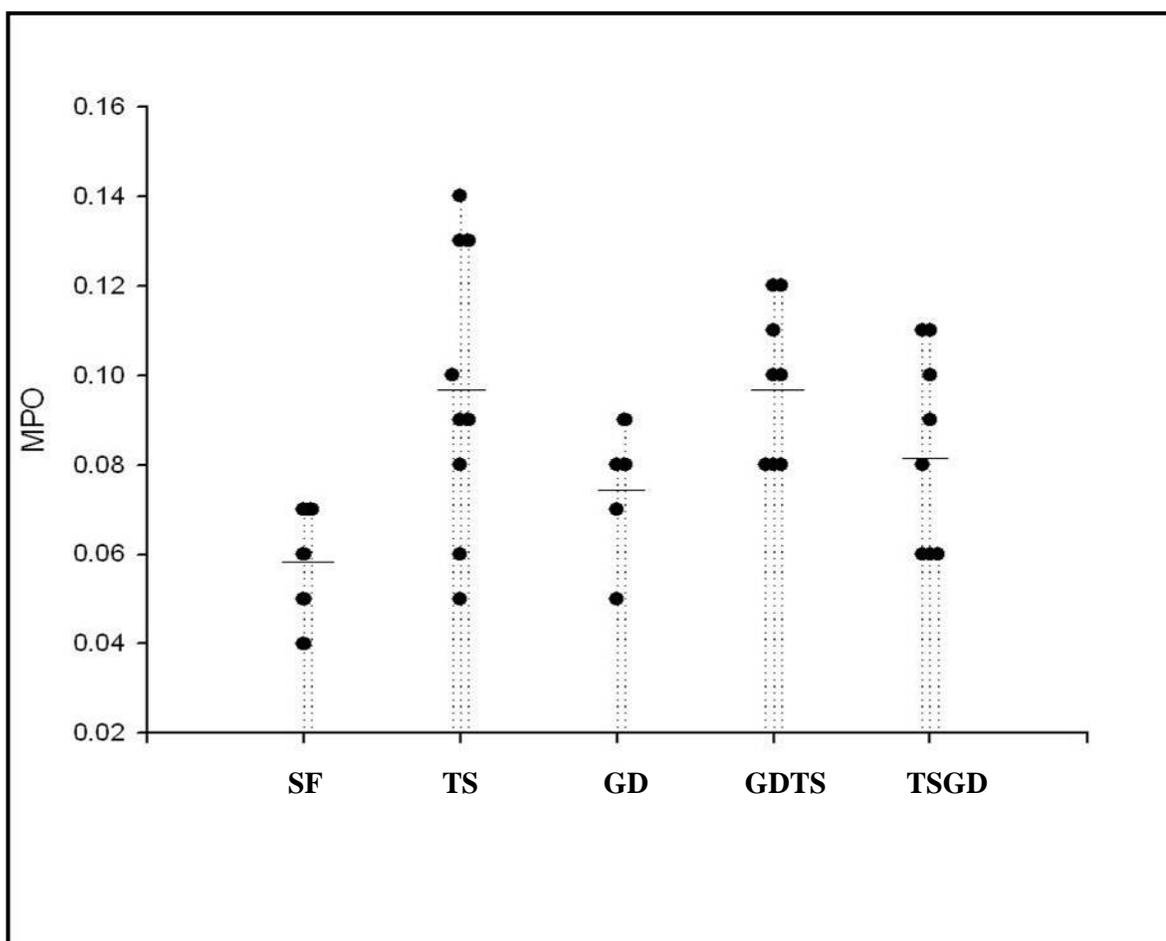


Figura 19. Dosagem atividade da mieloperoxidase pulmonar. ($p = 0,019$)

ANÁLISE HISTOLÓGICA

As tabelas abaixo mostram as comparações dos índices histológicos entre os grupos.

Tabela 7: Achados Histopatológicos – Tecido Pancreático – Mediana (min-máx)

VARIÁVEIS	SF	TS	GD	GDTS	TSGD	p
EDEMA	1 (0-2)*	2 (0-3)	1 (0-3)	3 (2-4)	2 (1-4)	0,025
NECROSE ACINAR	1 (0-2)†	4 (0-4)	1 (0-4)	4 (2-4)	4 (0-4)	0,011
HEMORRAGIA PARENQUIMA	1 (0-1)	2 (0-4)	0 (0-3)	1 (1-4)	2 (0-4)	0,262
HEMORRAGIA GORDURA	1 (1-2)	2 (1-4)	3 (0-4)	1 (0-4)	2 (1-4)	0,384
INFILTRADO INTRALOBULAR	1 (0-1)‡	2 (1-4)	1 (1-2)	3 (1-4)	2 (1-4)	0,030
NECROSE GORDUROSA	0 (0-2)	1 (0-4)	0 (0-2)	3 (0-4)	1 (0-4)	0,146
INFILTRADO PERIVASCULAR	0 (0-1)†	1 (1-4)	1 (1-2)	1 (0-4)	1 (1-4)	0,021
ESCORE PANCREATITE	5 (1-11)‡	16 (6-22)	7 (4-18)	16 (8-28)	11 (6-26)	0,016

* $p < 0,05$, comparado com o grupo GDTS; † $p < 0,05$, comparado com os grupos TS, GDTS e TSGD; ‡ $p < 0,05$, comparado com os grupos TS e GDTS.

Tabela 8: Achados Histopatológicos Tecido Pulmonar – Mediana (min-máx)

VARIÁVEIS	SF	TS	GD	GDTS	TSGD	p
EDEMA INTRA-ALVEOLAR	1 (0-1)	1 (1-3)	1 (0-2)	1 (1-2)	1 (1-4)	0,136
HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	1 (1-2)†	2 (1-3)	1 (0-1)*	2 (1-3)	3 (2-4)	0,001
INFILTRADO NEUTROFÍLICO	0 (0-2)‡	2 (1-3)	1 (0-1)‡	1 (1-2)	2 (1-3)	0,005
ESCORE LESÃO PULMONAR	3 (1-4)‡	5 (3-8)	3 (0-4)‡	5 (3-6)	6 (4-9)	<0,001

* $p < 0,05$, comparado com os grupos TS, GDTS e TSGD; † $p < 0,05$, comparado com o grupo TSGD; ‡ $p < 0,05$, comparados com os grupos TS e TSGD

DISCUSSÃO

DO MODELO EXPERIMENTAL ESCOLHIDO

O modelo experimental adotado foi baseado na técnica descrita por Aho et al, e escolhido por ser o que reproduz pancreatite semelhante à induzida por cálculos biliares em humanos, além de permitir o estudo da resposta inflamatória sistêmica⁽¹⁶⁾.

A concentração de tauracolato de sódio utilizada foi estabelecida de acordo com os estudos realizados por Tonini et al e Aho et al que demonstraram taxas de mortalidade variadas conforme a concentração utilizada^(16;19). Com concentração de 1% a mortalidade observada foi de 9% em 24 horas, sendo inferior à observada nos casos graves de pancreatite aguda em humanos⁽¹⁹⁾. O tauracolato de sódio a 4,5% e 5% produz taxas muito elevadas que variam de 71,4% em 72 horas e 100% em 31 horas, respectivamente, o que prejudica a avaliação de medidas terapêuticas⁽¹⁶⁾. Utilizando concentração a 3%, houve 23,5% de mortalidade em 72h nos ratos estudados por Aho et al.

Optamos por utilizar uma concentração intermediária de 3%, a qual propicia taxa de mortalidade próxima à encontrada na pancreatite aguda grave em humanos e permite o estudo da resposta inflamatória sistêmica após 24 horas da indução.

Quanto à perda de animais antes do período determinado para o término do experimento (24 horas), observamos 20% de óbitos no grupo TS representado por ratos com pancreatite, compatível com a encontrada no estudo de Aho et al⁽¹⁶⁾. Tendo em vista que os animais mortos eram verificados no dia seguinte à indução da pancreatite, não utilizamos estes ratos devido ao tempo impreciso do óbito o que não propiciou a coleta das amostras de forma adequada.

Nos grupos GDTS e TSGD, nos quais, foi utilizado cloreto de gadolínio antes e após a indução da pancreatite, a taxa de mortalidade observada no período anterior à eutanásia foi de 40 e 50%, respectivamente, sendo significativamente maior no grupo TSGD. Gloor et al demonstraram, em experimento que induzia pancreatite aguda em camundongos através de dieta deficiente em colina e suplementada com etionina, haver diminuição da mortalidade com o uso de cloreto de gadolínio em comparação com o grupo controle (52% vs 86% em 10 dias – $p < 0,001$)⁽⁶⁾. Portanto houve um contraste acentuado entre os resultados dos dois estudos.

A maioria dos estudos utilizou ratos com peso médio de 250-300g^(4;7;13). O peso preconizado para a indução de pancreatite através de infusão ductal fica em torno de 200-350g. Em nosso estudo a faixa de peso ficou entre 233-450g. Antes do início do experimento houve aumento significativo do peso médio do grupo GD em relação aos grupos TS e TSGD ($p=0,004$) que acreditamos não ter influenciado nos resultados.

DOS RESULTADOS E SUA INTERPRETAÇÃO

AMILASE

Todos os grupos tiveram indução de pancreatite (amilase sérica três vezes acima do limite superior do valor de referência). A dosagem de amilase, apesar de não constituir em marcador de gravidade para a pancreatite, foi diferente entre os grupos.

Houve maior aumento da amilase nos grupos com pancreatite induzida por tauracolato de sódio em relação aos grupos que utilizaram solução fisiológica intra-ductal. Além disso, os que utilizaram cloreto de gadolínio tiveram os valores mais elevados, sendo que, estatisticamente, o grupo GDTS apresentou dosagem superior aos grupos controle SF e GD ($p=0,009$).

Em outros estudos, o aumento da amilase foi similar nos grupos com pancreatite e que receberam gadolínio, sugerindo que a inibição das células de Kupffer não tinha efeito na intensidade do dano pancreático^(6;7;13).

TGO / TGP

Da mesma forma que os estudos realizados por Folch et al⁽⁷⁾ e Liu et al⁽¹³⁾, não houve influência do uso de gadolínio no aumento das transaminases, sugerindo não ocorrer dano hepatocelular relacionado ao experimento, sobretudo ao clameamento ductal que foi realizado.

TNF- α

Foi utilizado como marcador de inflamação sistêmica. Houve pequena expressão na dosagem de TNF- α , sugerindo resposta inflamatória sistêmica discreta. Por outro lado, houve tendência de maior produção de TNF nos grupos em que foi utilizado o tauracolato de sódio 3% (TS, GDTS e TSGD) quando comparados aos grupos controle (SF e GD). Todavia, esperávamos que houvesse diminuição nos níveis de TNF- α nos grupos que utilizaram tratamento com gadolínio (GDTS e TSGD). Ao contrário, houve aumento significativo no grupo que utilizou gadolínio 1 hora após a indução da pancreatite (grupo TSGD) em comparação aos grupos controle SF e GD ($p = 0,008$).

O estudo realizado por Gloor et al observou valores de TNF- α consideravelmente mais elevados nos grupos com pancreatite (605 ± 188 pg/mL), apresentando diminuição com o uso de cloreto de gadolínio como pré-tratamento (361 ± 86 pg/mL)⁽⁶⁾. Os demais estudos também demonstram diminuições nos níveis séricos de TNF- α , que variam de 21% a 55%, com o uso de cloreto de gadolínio^(4;6;7;13).

Neste estudo, não houve o efeito esperado do cloreto de gadolínio na diminuição dos níveis de TNF- α .

Em experimento realizado para pesquisar dano hepático em ratos Wistar com exposição à lipopolissacarídeos e submetidos ao bloqueio de células de Kupffer com cloreto de gadolínio, também foi relatado a ausência de efeito desta droga nos níveis de citocinas e de TNF- α ⁽²⁰⁾.

MPO

A dosagem da atividade da mieloperoxidase no tecido pulmonar é um marcador de infiltração neutrofílica. Houve uma tendência de obtenção de valores superiores de MPO nos grupos que tiveram indução de pancreatite por tauracolato de sódio, porém foram significativamente maiores nos grupos TS e GDTS em comparação ao grupo SF ($p = 0,019$).

Da mesma forma que a dosagem de TNF- α , esperávamos valores mais elevados de MPO nos grupos com pancreatite. Foram relatadas diminuições que variavam de 22% a 43% nos níveis de atividade da mieloperoxidase nos grupos que utilizaram gadolínio como pré-tratamento em comparação com os grupos com pancreatite^(4;6;7;13).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PANCREÁTICA

A pancreatite induzida por tauracolato de sódio obteve escores histológicos superiores à induzida por solução fisiológica. A elevação dos escores nos grupos que utilizaram solução fisiológica pode ser explicada pelo simples fato da possibilidade de hipertensão ductal durante a infusão.

O edema pancreático foi significativamente maior no grupo GDTS em comparação ao grupo controle – SF.

A necrose acinar foi significativamente mais intensa nos grupos que tiveram indução de pancreatite por tauracolato de sódio (TS, GDTS e TSGD) em comparação com o grupo SF.

O infiltrado de leucócitos no parênquima foi mais elevado nos grupos TS e GDTS em comparação com o grupo SF.

A infiltração perivascular foi significativamente mais intensa nos grupos com pancreatite induzida por tauracolato em comparação com o grupo controle SF.

O escore final do dano pancreático, composto pelos acima, foi significativamente maior nos grupos TS e GDTS em comparação com o grupo SF.

Houve indução de pancreatite aguda em todos os grupos comprovada pelos achados histológicos, sendo mais intensa nos grupos que utilizaram tauracolato de sódio estando de acordo com outros estudos realizados^(16;21;22).

Era esperado que houvesse aumento significativo dos escores avaliados nos grupos TS, GDTS e TSGD em comparação como os grupos SF e GD. No entanto, não houve diferenças com o grupo controle – GD, o que pode sugerir efeito potencializador do cloreto de gadolínio no dano pancreático.

Se compararmos os grupos que utilizaram cloreto de gadolínio (TSGD e GDTS) com o grupo TS não se observa influência do uso desta droga nos escores histológicos de pancreatite induzida por tauracolato de sódio, estando de acordo com outros estudos^(4;6;7).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PULMONAR

O dano pulmonar foi avaliado por escores histológicos que tenderam a ser maiores nos grupos com pancreatite induzida por tauracolato em comparação aos que foi infundida solução salina. Houve aumento significativo do escore de lesão pulmonar nos grupos TS e TSGD em comparação aos grupos SF e GD.

A hemorragia intra-alveolar foi maior nos grupos TS, GDTS e TSGD em comparação com o grupo GD. Além disso, o grupo TSGD também teve escores de hemorragia intra-alveolar mais elevados comparado com o grupo SF.

Quanto ao infiltrado neutrofílico podemos observar que os grupos TS e TSGD tiveram aumento significativo ($p=0,005$) em comparação aos grupos controle SF e GD.

Esperava-se que houvesse diferenças entre o grupo TS e os grupos controle SF e GD e que os grupos que utilizaram cloreto de gadolínio como tratamento e pré-tratamento tivessem escores inferiores ao encontrados no grupo TS.

O uso do gadolínio não diminuiu os escores de lesão pulmonar nos ratos estudados.

CONCLUSÕES

O modelo experimental utilizado induziu pancreatite aguda em todos os grupos, sendo mais intensa nos grupos submetidos à infusão de tauracolato de sódio a 3%, como pode ser observada pelos escores histológicos e pela dosagem da amilase.

Houve demonstração de dano pulmonar através da análise histológica. Por outro lado, não houve evidência inequívoca de resposta inflamatória sistêmica pelos baixos valores de TNF- α e MPO observados nos grupos com pancreatite induzida por tauracolato de sódio.

Apesar de ter sido verificado histologicamente o dano pulmonar, não foi possível demonstrar de forma substancial os benefícios com o uso de cloreto de gadolínio tanto de forma profilática (24 horas antes da indução da pancreatite aguda), como também de forma terapêutica (uma hora após a indução) devido à falha na comprovação bioquímica da indução de resposta inflamatória sistêmica.

O fato de ter havido maiores perdas de animais (óbitos antes do tempo previsto para o término do experimento – 24 horas) nos grupos com pancreatite aguda e que utilizaram cloreto de gadolínio sugere haver efeito adverso desta droga neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. *Clin Lab Med* 2005 Mar;25(1):17-37.
- (2) Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet* 2008 Jan 12;371(9607):143-52.
- (3) Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 2007 Sep;133(3):1056.
- (4) Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, et al. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2000 Nov;21(4):414-20.
- (5) Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 2005 Dec;24 Suppl 1:45-51.
- (6) Gloor B, Todd KE, Lane JS, Lewis MP, Reber HA. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J Gastrointest Surg* 1998 Sep;2(5):430-5.
- (7) Folch E, Prats N, Hotter G, Lopez S, Gelpi E, Rosello-Catafau J, et al. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000 Aug;45(8):1535-44.
- (8) Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol* 2007 Mar;211(4):383-8.
- (9) Hoyos S, Granell S, Heredia N, Bulbena O, Closa D, Fernandez-Cruz L. Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery* 2005 Feb;137(2):186-91.
- (10) Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F, Hadengue A, Morel P, Frossard JL. Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006 Feb 28;12(8):1219-24.
- (11) Closa D, Bardaji M, Hotter G, Prats N, Gelpi E, Fernandez-Cruz L, et al. Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol* 1996 Jan;270(1 Pt 1):G6-13.
- (12) Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR, Jr., et al. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003 Jan;7(1):20-5.
- (13) Liu HB, Cui NQ, Li DH, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol* 2006 Jan 21;12(3):403-7.

- (14) 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 Nov;80(1):110-4.
- (15) Gallagher SF, Yang J, Baksh K, Haines K, Carpenter H, Epling-Burnette PK, et al. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res* 2004 Dec;122(2):201-9.
- (16) 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.
- (17) 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 Jan;215(1):44-56.
- (18) Festugato M, Coelho CP, Fiedler G, Machado FP, Goncalves MC, Bassani FR, et al. Hyperbaric oxygen therapy effects on tissue lesions in acute pancreatitis. Experimental study in rats. *JOP* 2008;9(3):275-82.
- (19) Tonini KC, Speranzini MB, Neves MM, Rodrigues C, Goldenberg S. Pancreatite aguda necro-hemorrágica induzida por tauracolato de sódio. Estudo das lesões anatomopatológicas em ratos. *Acta Cir Bras* 1993;8(3):96-103.
- (20) Granado M, Martin AI, Priego T, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium administration prevents lipopolysaccharide-induced decrease in liver insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 gene expression. *J Endocrinol* 2006 Mar;188(3):503-11.
- (21) Aho HJ, Suonpaa K, Ahola RA, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ductal factors in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis. *Exp Pathol* 1984;25(2):73-9.
- (22) Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res* 1983;15(1):28-36.

Effects of Gadolinium Chloride on the Treatment of Experimental Acute Pancreatitis Sodium Taurocholate-Induced in Rats

Diego da Fonseca Mossmann¹; Maria Isabel Albano Edelweiss^{1,4,6}; Jane Maria Kulczynski^{4,6}; Norma Anair Possa Marroni³; Néelson Alexandre Kretzmann²; Catielle Antunes⁶; Oscar Augusto Birkhan⁶; Alessandro Bersch Osvaldt^{1,5}.

¹Postgraduate Program in Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

³Laboratory of Experimental Hepatology-Physiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴Service of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁵Service of Digestive Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁶Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Running title: Effects of gadolinium chloride on experimental pancreatitis

Acknowledgements to the financial support granted by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Corresponding Address:

Diego da Fonseca Mossmann

Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

- Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903, Porto Alegre (RS)

Brazil

Phone: +55 51 9249 2339

FAX: +55 51 2101 8000

e-mail: dmossmann@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the effects of the use of gadolinium chloride before and after induction of acute pancreatitis with sodium taurocholate 3% in rats.

Methods: Wistar rats were divided into 5 groups: **SF** - control with saline intra-ductal and IV, **GD** - control with saline intra-ductal and gadolinium chloride IV; **TS** - with AP control induced by sodium taurocholate 3% and saline IV; **GDTs** - pre-treatment with GD (24 hours before the induction of AP) and **TSGD** - treatment with GD (1h after the induction of AP). Analysis was made in serum amylase, transaminases and TNF- α ; determination of the MPO activity in lung tissue, lung and pancreatic histology.

Results: The number of dead animals before the end of the experiment was significantly higher in TSGD ($P = 0.046$). The scores of pancreatitis and lung damage were higher in the groups that used sodium taurocholate compared to groups with intra-ductal infusion of saline solution. There were no differences in other variables studied when comparing TS, GDTs and TSGD groups.

Conclusions: In this study, the benefits with the use of gadolinium chloride as a prophylactic and therapeutic drug were not demonstrated.

Keywords: sodium taurocholate; gadolinium chloride; acute pancreatitis; lung injury

INTRODUCTION

Acute pancreatitis leads to the production of inflammatory response which is directly responsible for morbidity and mortality of illness¹⁻⁷. Experimental studies showed the involvement of the Kupffer cells in the process increases the systemic inflammatory response through the activation of these cells by cytokines produced by inflamed pancreas^{2, 4, 8-14}.

In some experimental studies, prophylactic blockage of Kupffer cells by gadolinium chloride showed to be promising into reducing the mortality and pulmonary damage^{2, 4, 15}. On the other hand, the effects of this drug are not fully clarified, as it has been utilized only as pretreatment^{2, 4, 8, 11, 13, 15-17}.

The purpose of this study is to evaluate the effects of the use of gadolinium chloride before and after the induction of acute pancreatitis in rats through the experimental model with infusion of sodium taurocholate in the biliopancreatic duct.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLE

The study utilized 65 male Wistar rats (*Rattus norvergicus albicans*), weighing 233-450 g. The animals that did not survive until euthanasia was performed were replaced, to keep the distribution established for the sample calculation of five animals in groups SF and GD and nine animals in the other groups. Table 1 shows the division of the experimental groups¹⁸.

ACUTE PANCREATITIS INDUCTION

All animals, after a 6-hour fast, were anesthetized with chloridrate of ketamine at 50 mg/kg (*Dopalen*®, *Sespo Indústria e Comércio LTDA, Jacareí, São Paulo*), along with chloridrate of xylazine at 20 mg/kg (*Anasedan*®, *Sespo Indústria e Comércio LTDA, Jacareí, São Paulo*), by an intraperitoneal injection. The surgical procedure was as follows: median laparotomy of approx. 2 cm long followed by duodenum exteriorization with identification of pancreas and biliopancreatic duct on mesenteric face of duodenal bulb (Figure 1A). After that, a punctiform duodenectomy was performed at the antimesenteric edge. A transpapilar cannulation of the biliopancreatic duct was obtained with nº 24 G catheter (*peripheral intravascular catheter by Jelco – Teflon, Medex Medical LTD, England*) for approximately 5 mm, avoiding damages to pancreas (Figure 1B)¹⁹. After that, a temporary occlusion of the biliopancreatic duct was performed at the liver hilum with a delicate vascular clamp that remained until the end of the infusion (Figure 1C). Pancreatitis induction was performed through retrograde infusion of 0.5 mL sodium taurocholate at 3% (*Taurocholic acid sodium salt hydrate – synthesized from cholic acid -T4009-, Sigma-Aldrich, New Zealand*), using an infusion pump at the speed of 0.1 mL/min¹⁸.

After the clamp removal, the catheter was also removed, the duodenal orifice was needle sutured with monofilament thread of polypropylene 7-0 (*Premilene*®, *B-BRAUN Medical, Bogotá, Colombia*) and the abdomen was closed at a single plane with monofilament thread of nylon 4-0 (*Shalon*®, *Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás, Brazil*).

In **SF** and **GD** groups, the procedures were performed identically, except for the injection of taurocholate, which was replaced with a saline solution.

The infusion of gadolinium chloride at 4% (*gadolinium chloride anhydrous,*

Aldrich) at the dose of 10 mg/kg (approximately 0.250 mL) was performed in the pretreatment group (**GDTS**) through the jugular vein 24 hours before pancreatitis induction¹⁵. In the treatment group (**TSGD**), gadolinium chloride was infused 1 hour after the induction. The control was performed with the infusion of the saline solution.

Euthanasia occurred 24 hours after the experiment start through exsanguination. They were anesthetized as previously described. After that, the thoracic cavity was opened through median sternotomy, 3 to 4 mL of blood was collected through cardiac puncture and the lungs were removed through dissection.

After that, the abdominal cavity was opened through the previous incision to remove the entire pancreas en bloc.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Blood was collected through cardiac puncture and conditioned in plastic tubes (*Vacurette 4mL, Greiner Bio-one, Brazil, Americana, São Paulo*), which were centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes, and serum was separated and stored at -80°C. The right lung was collected for the analysis of myeloperoxidase activity (indirect indicator of pulmonary neutrophilic infiltrate), through delicate dissection followed by washing with saline solution with EDTA at 10%, conditioning in aluminum paper, freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C. Pancreatic and pulmonary tissues (left lung) were conserved in buffered formalin at 10% for 24 hours.

The animals were excluded from the study according to the following criteria: animals whose pancreas was damaged during the biliopancreatic duct cannulation or when there was duct perforation during this procedure, death before the expected time for the experiment conclusion (24 hours); and samples of hemolyzed blood (Table 2).

HISTOPATHOLOGIC ANALYSIS

Pancreas

After the dissection, the pancreas was processed in paraffin blocks and sections of 5 µm were performed, each slide was comprised of two samples stained through hematoxilin-eosine technique.

The slides were randomly numbered in such way that it was not enable their identification; they were analyzed by a pathologist expert in experimental pancreatic pathology, using an adaptation of the standardized scale of Schmidt et al ¹⁹, which include analysis of edema, acinar necrosis, hemorrhage in parenchyma and in fatty tissue, fat necrosis and intralobular and perivascular infiltrate, whose graduation allowed the evaluation of a total score of 28 points.

Lung

The microscopic analysis of the pulmonary tissue was similarly performed and evaluated the following: intra-alveolar edema, intra-alveolar hemorrhage and neutrophilic infiltrate. The scores were as follows: 0-absent; 1-mild; 2-moderate; 3-intense; 4-very intense.

HISTOPATHOLOGIC CRITERIA

Pancreas

Edema: presence of serum liquid or widening of intercellular, interacinar, interlobular and interlobar spaces.

Acinar Necrosis: considered as cytoplasmatic degenerative alterations with the

presence of degenerated nuclei, or in karyolysis.

Fat necrosis: adipose tissue necrosis, associated or not with hemorrhage in peripancreatic or intrapancreatic tissue (Figure 2A).

Hemorrhage: presence of erythrocytes outside the vascular bed.

Perivascular infiltrate: presence of polymorphonuclear and mononuclear infiltrate adjacent to blood vessels or in diapedesis, permeating the vascular wall.

Intralobular infiltrate: presence of polymorphonuclear and mononuclear infiltrate inside the lobular parenchyma (Figure 2B).

Lung

Intra-alveolar edema: presence of serum-like liquid inside the pulmonary alveolus (Figure 3A).

Intra-alveolar hemorrhage: presence of erythrocytes inside the alveoli (Figure 3B).

Pulmonary neutrophilic infiltrate: presence of polymorphonuclear infiltrate in alveolar septa or inside the alveoli (Figure 3C).

BIOCHEMICAL ANALYSIS

Duplicate *amylase* dosages were performed using colorimetric enzymatic test (Cobas, Roche, Indianapolis, USA) (reference values based on rats without pancreatitis: 530-810 U/L)²⁰.

Duplicate *transaminases (AST and ALT)* dosages were performed using UV test (Cobas, Roche, Indianapolis, USA). Reference values: AST (81±11.7 U/L); ALT

(51±12.3 U/L).

The activity of myeloperoxidase (MPO) enzyme was utilized as indicator of inflammatory neutrophilic activity in the lung. Samples of the pulmonary tissue were stored in liquid nitrogen. On the assay day, for each 50 mg of the tissue weight, 500 µL of homogenization buffer (hexadecyltrimethylammonium bromide 50 mM and potassium phosphate buffer 0.1 M) were added. The tissues were homogenized, submitted to ultrasound (40 Hz) for 15 seconds, frozen and unfrozen three times in liquid nitrogen, and centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4°C. For the enzymatic kinetic reaction, 140 µL of potassium phosphate buffer (0.1 M), 10 µL of sample and 10 µL of ortho-dianisidine 2% were added, and just before reading 12 µL of H₂O₂ 20 mM were added. The enzymatic kinetics was analyzed on a plate of 96 wells at 450 nm. The results were expressed as absorbance/min/mg of protein.

The TNF-α concentration in serum samples were performed using ELISA method, according to the manufacturer's instructions (Kit RAT TNF-alpha, R&D System, USA). The lower limit of TNF-α detection for this method was 10 pg/mL.

STATISTICAL ANALYSIS

The qualitative variables were described through percentage absolute and relative frequencies, with comparison between the groups using the Chi-square test. The quantitative variables with symmetric distribution were described through mean and standard deviation and the variables with asymmetric distribution through median, min. and max. values.

For the comparison of mean serum level of amylase, AST, ALT, MPO and TNF-α in the different groups, analyses of variance (ANOVA) were performed, followed by Tukey' post-Hoc test for multiple comparison.

Kruskal-Wallis test was utilized for the comparison of histological scores of acute pancreatitis and pulmonary lesion in the different groups, and subsequently, the transformation into posts of variables with asymmetric distribution was performed, and these posts were compared using Tukey's post-Hoc test. SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), version 14.0, was utilized for the statistical data analysis.

ETHICS

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under nº 06-259.

RESULTS

Considering the 65 animals included in the study, four were excluded due to biliopancreatic duct perforation during cannulation (n=2 / GDTS and TSGD groups) and death during anesthetic time (n=2 / TS and TSGD groups) (Table 3).

Considering the 61 remaining animals, 19 (31.1%) died after the induction of pancreatitis, in the period before euthanasia, and, for this reason, they were not utilized in the biochemical and histological analysis. They were distributed as follows: 3/15 in TS group, 6/15 in GDTS group and 10/20 in TSGD group. The statistical analysis showed a significantly greater loss of animals in TSGD group ($P=0.046$). There were no deaths before the time determined for the experiment conclusion in SF and GD control groups (Table 3).

Considering the 42 animals (68.9%) that survived until the end of the experiment, five blood samples were hemolyzed and were excluded (1/6 in SF group, 3/12 in TS

group and 1/10 in TSGD group) (Table 3).

Total losses were: 28/65 (43.07%) animals, 1/6 (16.66%) in SF group, 0/5 (0%) in GD group, 7/16 (43.75%) in TS group, 7/16 (43.75%) in GDTS group and 13/22 (59.09%) in TSGD group.

BIOCHEMICAL ANALYSIS

All animals had the acute pancreatitis through amylase dosage at least three times the upper limit of the reference value (Table 4; Figure 4).

Table 4 and Figures 5 and 6 show the results of TNF- α dosage and MPO activity.

HISTOLOGICAL ANALYSIS

Acinar necrosis was significantly more intense in the groups that had sodium taurocholate-induced pancreatitis (TS, GDTS and TSGD) if compared to SF group. The total score of pancreatic lesion was significantly higher in TS and GDTS groups, if compared to SF group.

The pulmonary lesion score was higher in the groups that had sodium taurocholate-induced pancreatitis, with no differences attributed to the utilization of gadolinium chloride.

The other histological indexes of pancreatitis and pulmonary lesion are presented in Tables 5 and 6, respectively.

DISCUSSION

The current experimental model was based on the technique described by Aho et al. It was chosen because it reproduces pancreatitis similarly to that induced by

gallstone in humans, and for enabling the study of the systemic inflammatory response

¹⁸

The concentration of sodium taurocholate was established according to the studies of Tonini et al and Aho et al that demonstrated higher mortality rates the higher the concentration used^{18, 21}. With the concentration at 1%, the mortality observed was 9% within 24 hours, lower than that observed in severe cases of acute pancreatitis in humans²¹. Sodium taurocholate at 4.5% and 5% produce very high mortality rates that range from 71.4% in 72 hours to 100% within 31 hours, respectively, which affects the evaluation of therapeutic measurements¹⁸. With the concentration at 3%, the mortality observed was 23.5% within 72 hours in rats studied by Aho et al¹⁸.

Our choice of an intermediate concentration of 3% aimed to use a merger to produce mortality in the experiment similar to what occurs in cases of severe acute pancreatitis in humans and to allow the study of systemic inflammatory response in 24 hours after induction.

Regarding the loss of animals before the period established for the experiment conclusion (24 hours), we observed 20% of deaths in TS group, represented by rats with pancreatitis, compatible with that found in the study conducted by Aho et al¹⁸. Considering that the dead animals were observed on the day after the pancreatitis induction, we did not utilize these rats, due to imprecise death time, which did not enable the adequate sample collection.

The deaths occurred only in groups with sodium taurocholate-induced pancreatitis. In GDTS and TSGD groups, in which gadolinium chloride was utilized before and after the pancreatitis induction, the mortality rate observed in the period before euthanasia was 40 and 50%, respectively, significantly greater in TSGD group. Gloor et al demonstrated, in an experiment that induced acute pancreatitis through

choline-deficient and ethionine-supplemented diet, reduced mortality with the utilization of gadolinium chloride when compared to the control group (52% vs. 86% within 10 days – $P < 0.001$)⁴. Therefore, regardless of the methodological differences, there was an accentuated contrast between the mortality rates, if compared to this study. Acute pancreatitis induction was confirmed in all groups through histological findings, and it was more intense in groups that utilized sodium taurocholate, which agrees with other studies^{18, 22, 23}. The elevation of scores in the groups that utilized physiological solution can be explained by duct hypertension that occurred during the infusion. We expected a significant increase of scores evaluated in TS, GDTS and TSGD groups when compared to SF and GD groups. However, there were no differences in the comparison to control group – GD, which can suggest a boosting effect of gadolinium chloride on pancreatic lesion.

Agreeing with other studies, there was no influence of the utilization of gadolinium chloride on the serum levels of amylase^{4, 8, 15} and on histological scores of pancreatitis^{2, 4, 11, 15, 16}.

TNF- α was used as a marker of systemic inflammation. A small expression in the TNF- α dosage was observed, suggesting a mild systemic inflammatory response. On the other hand, there was a tendency to increased production of TNF in the groups that utilized sodium taurocholate 3% (TS, GDTS and TSGD), when compared to control groups (SF and GD). However, we expected reduced levels of TNF- α in the groups that utilized gadolinium (GDTS and TSGD). On the contrary, a significant increase was observed in the group that utilized gadolinium 1 hour after the pancreatitis induction (TSGD group) when compared to SF and GD control groups ($P = 0.008$).

The study conducted by Gloor et al observed considerably higher values of TNF- α in the groups with pancreatitis, presenting reduction with the utilization of

gadolinium chloride as pretreatment⁴. The other studies also demonstrate reduced serum levels of TNF- α , ranging from 21% to 55%, with the utilization of gadolinium chloride^{2, 4, 8, 15}. Our study did not observe the expected effect of gadolinium chloride on the reduction of TNF- α levels, as in other studies. In an experiment conducted to study the hepatic lesion in Wistar rats exposed to lipopolysaccharides submitted to Kupffer cell blockade with gadolinium chloride also reported the absence of effect of this drug on cytokine and TNF- α levels²⁴. In another study conducted by Gloor et al, the reduction of 21% in TNF- α levels in the group pretreated with gadolinium chloride was not statistically significant when compared to the group without treatment¹⁶.

The dosage of myeloperoxidase activity in the pulmonary tissue is a marker of neutrophilic infiltration. A tendency to higher values of MPO was observed in the groups that had sodium taurocholate-induced pancreatitis, but they were significantly higher in TS and GDTS groups when compared to SF group ($P = 0.019$). As with the dosage of TNF- α , higher values of MPO were expected in the groups with pancreatitis. Reductions were reported ranging from 22% to 43% in the levels of myeloperoxidase activity in the groups that utilized gadolinium as pretreatment, when compared to the groups with pancreatitis^{2, 4, 8, 15, 16}.

The pulmonary lesion was evaluated through histological scores that tended to increase in the groups with sodium taurocholate-induced pancreatitis, when compared to those that utilized saline solution infusion. A significant increase of pulmonary lesion score was observed in TS and TSGD groups, when compared to SF and GD groups. We expected to have differences between TS group and SF and GD control groups and that the groups that utilized gadolinium chloride as treatment and pretreatment would present lower scores than those found in TS group. The utilization of gadolinium did not reduce the pulmonary lesion scores in the studied rats, unlike the studies

conducted by Gloor et al and Liu et al, which showed reduction from 25 to 29%, respectively, in the pulmonary lesion scores of rats pretreated with gadolinium^{2, 15}. In another study conducted by Gloor et al, a reduction of only 7% was observed in the pulmonary lesion, without statistical significance¹⁶.

CONCLUSIONS

The experimental model utilized induced acute pancreatitis in all groups and was more intense in the groups submitted to the infusion of sodium taurocholate at 3%, as indicated by the histological scores and amylase dosage.

The histological analysis demonstrated pulmonary lesion. On the other hand, there was no unequivocal evidence of systemic inflammatory response due to the low values of TNF- α and MPO observed in the groups with sodium taurocholate-induced pancreatitis.

Although the pulmonary lesion could be histologically demonstrated, it was not possible to substantially evaluate the benefits with the utilization of gadolinium chloride in prophylactic form (24 hours before the acute pancreatitis induction) and in therapeutic form (one hour after the induction), due to failure in the biochemical confirmation of the systemic inflammatory response induction.

The high number of animal losses (deaths before the expected time for the experiment conclusion – 24 hours) in the groups with acute pancreatitis that utilized gadolinium chloride suggests the presence of adverse effect of this drug on this experimental model.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Dr. **Roseli de Oliveira Möllerke** (*in memoriam*) for her help and incentive during the study execution.

Reference List

- (1) Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet* 2008 January 12; 371(9607):143-52.
- (2) Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA et al. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2000 November; 21(4):414-20.
- (3) Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 2005 December; 24 Suppl 1:45-51.
- (4) Gloor B, Todd KE, Lane JS et al. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J Gastrointest Surg* 1998 September; 2(5):430-5.
- (5) Beger HG, Rau B.M. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management. *World J Gastroenterol* 2007 October 14; 13(38):5043-51.
- (6) Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW et al. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 2007 September; 133(3):1056.
- (7) Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. *Clin Lab Med* 2005 March; 25(1):17-37.

- (8) Folch E, Prats N, Hotter G et al. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000 August; 45(8):1535-44.
- (9) Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol* 2007 March; 211(4):383-8.
- (10) Hoyos S, Granell S, Heredia N et al. Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery* 2005 February; 137(2):186-91.
- (11) Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F et al. Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006 February 28; 12(8):1219-24.
- (12) Closa D, Bardaji M, Hotter G et al. Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol* 1996 January; 270(1 Pt 1):G6-13.
- (13) Murr MM, Yang J, Fier A et al. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003 January; 7(1): 20-5.
- (14) Closa D, Sabater L, Fernandez-Cruz L et al. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 1999 February; 229(2):230-6.
- (15) Liu HB, Cui NQ, Li DH et al. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol* 2006 January 21; 12(3):403-7.

- (16) Gloor B, Todd KE, Lane JS et al. Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice. *J Surg Res* 1998 November; 80(1):110-4.
- (17) Gallagher SF, Yang J, Baksh K et al. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res* 2004 December; 122(2):201-9.
- (18) 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.
- (19) Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992 January; 215(1):44-56.
- (20) Festugato M, Coelho CP, Fiedler G et al. Hyperbaric oxygen therapy effects on tissue lesions in acute pancreatitis. Experimental study in rats. *JOP* 2008; 9(3): 275-82.
- (21) Tonini KC, Speranzini MB, Neves MM et al. Pancreatite aguda necro-hemorrágica induzida por tauracolato de sódio. Estudo das lesões anatomopatológicas em ratos. *Acta Cir Bras* 1993; 8(3):96-103.
- (22) Aho HJ, Suonpaa K, Ahola RA et al. Experimental pancreatitis in the rat. Ductal factors in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis. *Exp Pathol* 1984; 25(2):73-9.
- (23) Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res* 1983; 15(1):28-36.
- (24) Granado M, Martin AI, Priego T et al. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium

administration prevents lipopolysaccharide-induced decrease in liver insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 gene expression. *J Endocrinol* 2006 March; 188(3):503-11.

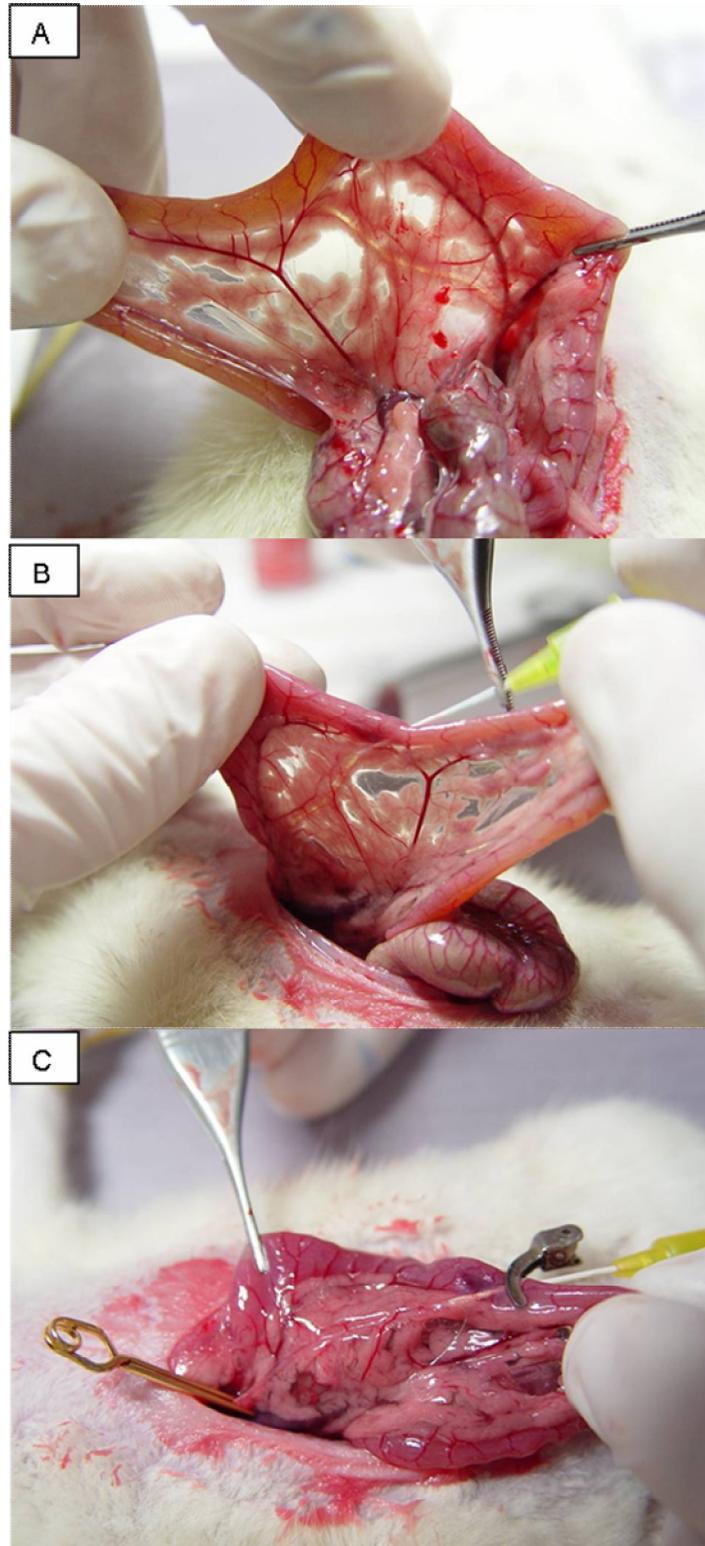


Figure 1. View of biliopancreatic duct (A) and cannulation (B). Clipping of biliopancreatic duct at the hepatic hilum level (gold clip) (C).

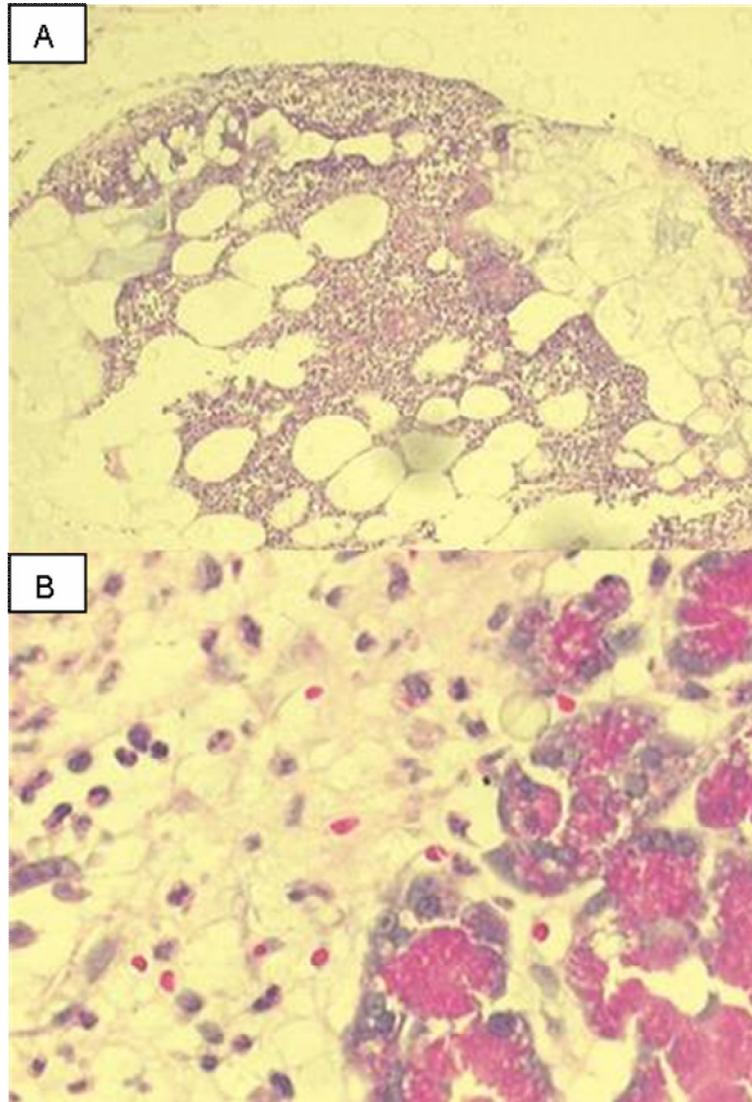


Figure 2. Steatonecrosis (A) and intralobular infiltrate (B).

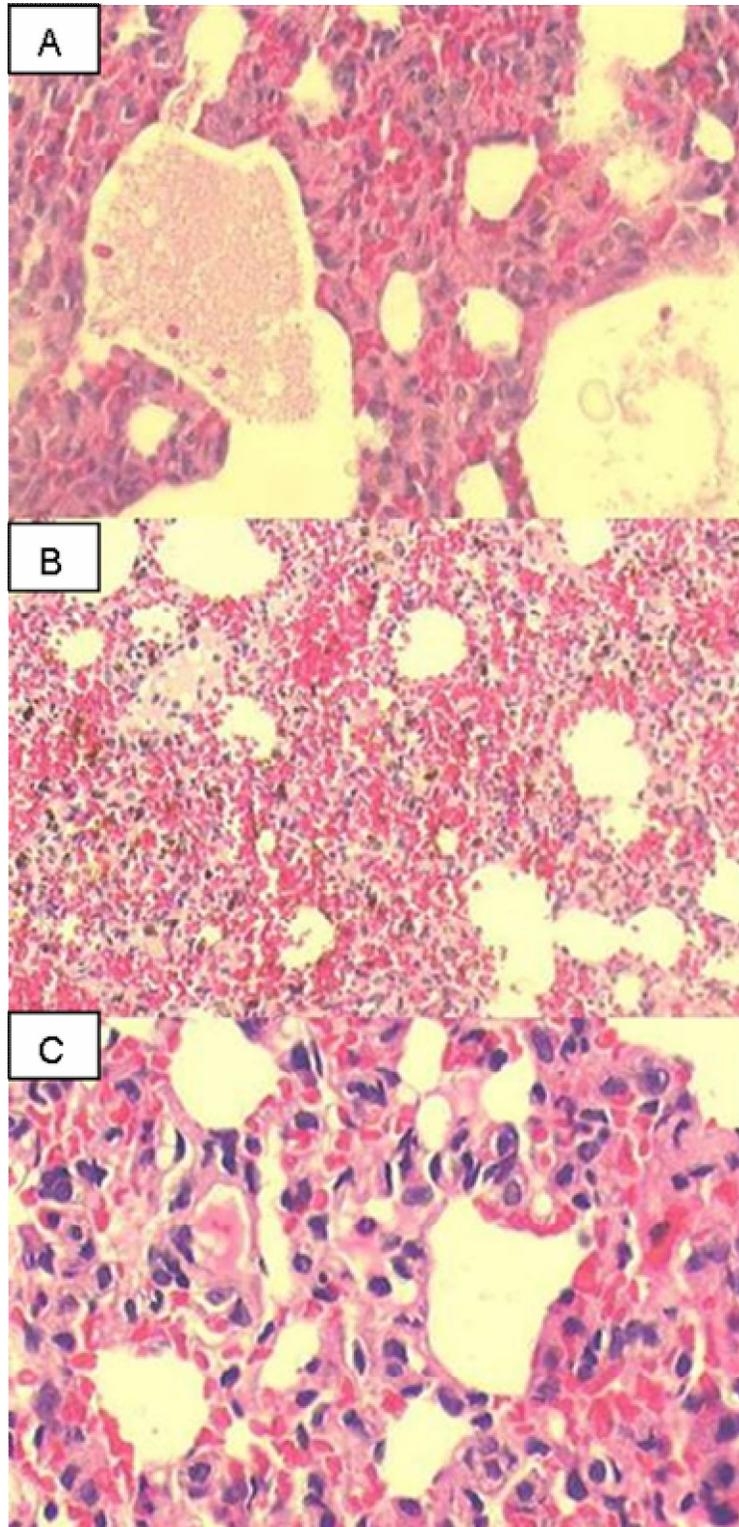


Figure 3. Edema (A) and intra-alveolar hemorrhage (B). Pulmonary neutrophilic infiltrate (C).

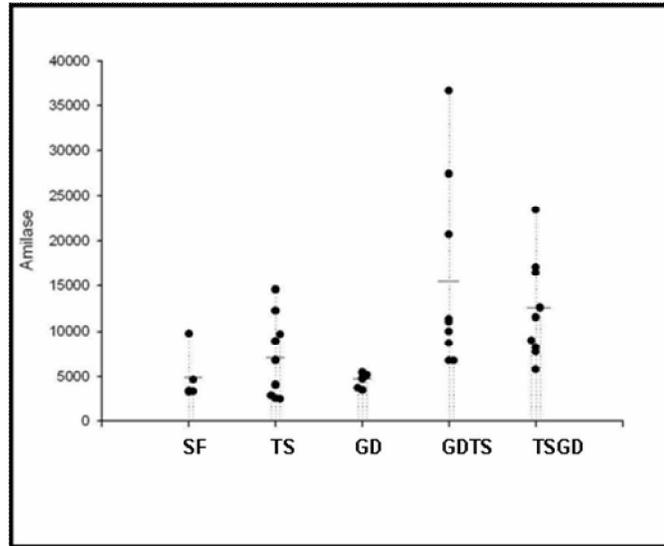


Figure 4. Serum levels of amylase (U/L).

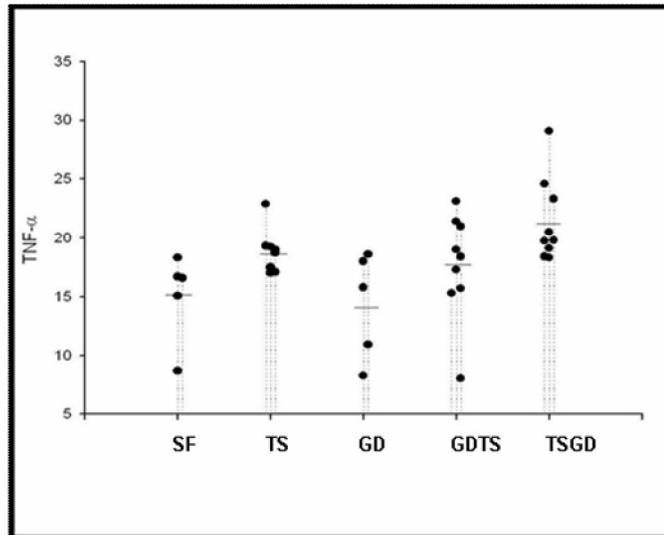


Figure 5. Serum levels of TNF-α (pg/mL).

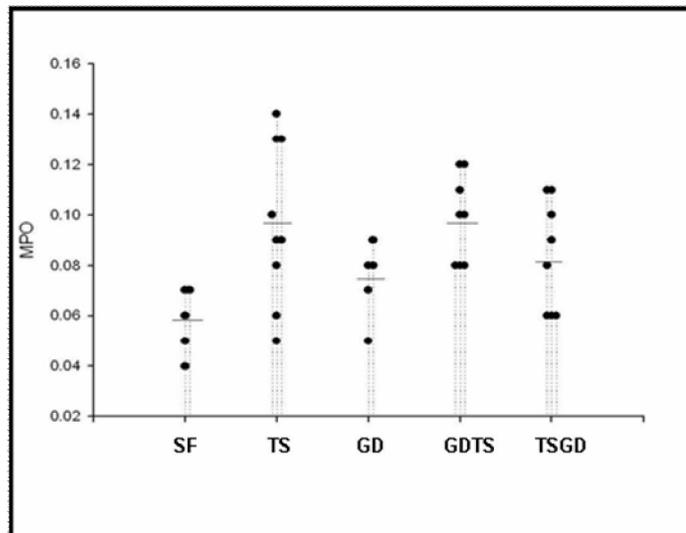


Figure 6. Pulmonary MPO activity (absorbance/min/mg prot).

TABLE 1: Experimental Groups

<i>Group</i>	<i>Rats</i>	<i>IV 24h before</i>	<i>Biliopancreatic duct cannulation</i>	<i>IV 1h after</i>	<i>Euthanasia 24h after</i>
<i>SF</i>	6	Saline 0.9%	Saline 0.9%	Saline 0.9%	6 rats
<i>TS</i>	16	Saline 0.9%	Sodium Taurocholate at 3%	Saline 0.9%	12 rats
<i>GD</i>	5	Gadolinium	Saline 0.9%	Saline 0.9%	5 rats
<i>GDTS</i>	16	Gadolinium	Sodium Taurocholate at 3%	Saline 0.9%	9 rats
<i>TSGD</i>	22	Saline 0.9%	Sodium Taurocholate at 3%	Gadolinium	10 rats

TABLE 2: Excluded Animals

<i>Number of Rats per Group</i>	<i>During the Procedure or Deaths Before 24h</i>	<i>Submitted to Euthanasia</i>	<i>Hemolyzed Samples</i>	<i>Analyzed</i>
SF = 6	0	6	1	5
TS= 16	4	12	3	9
GD= 5	0	5	0	5
GDTS= 16	7	9	0	9
TSGD= 22	12	10	1	9

TABLE 3: Descriptive

<u><i>Variables</i></u>	<i>SF</i>	<i>TS</i>	<i>GD</i>	<i>GDTS</i>	<i>TSGD</i>	<i>P</i>
<i>Weight (Mean±SD) (grams)</i>	368.3±35.22	335.7±62.18	410.6±23.14*	371.7±46.11	330.4±44.40	0.004
<i>Procedure Time (Mean±SD) (minutes)</i>	9.6±5.08	12.4±5.01	12±1.00	11.2±3.15	10.5±3.17	0.126
† <i>Exclusions During the Procedure n(%)</i>	0 (0%)	1 (6.3%)	0 (0%)	1 (6.3%)	2 (9.1%)	0.902
† <i>Deaths Before 24H n(%)</i>	0 (0%)	3 (20%)	0 (0%)	6 (40%)	10 (50%)	0.046
† <i>Hemolyzed Samples n(%)</i>	1 (16.7%)	3 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	0.404

* $P < 0.05$ compared to TS and TSGD groups; † Chi-square test

TABLE 4: Biochemical Analysis (Mean±SD)

<i>Variables</i>	<i>SF</i>	<i>TS</i>	<i>GD</i>	<i>GDTS</i>	<i>TSGD</i>	<i>P</i>
<i>Amylase (U/L)</i>	4905.6±2758.8	7153.6±4460.12	4527.4±872.49	15481±10495.32*	12424.3±5641.94	0.009
<i>ALT(U/L)</i>	54.4±14.29	113.4±85.51	107±43.14	105.8±63.47	125.2±75.25	0.448
<i>AST (U/L)</i>	214.6±69.45	449.3±517.16	310±36.11	425.4±261.32	410.4±142.52	0.636
<i>TNF – α (pg/ml)</i>	15.08±3.74	18.6±1.83	14.32±4.52	17.7±4.44	21.4±3.59*	0.008
<i>MPO</i> (<i>absorbance/min/mg prot</i>)	0.058±0.013†	0.096±0.031	0.074±0.015	0.096±0.017	0.081±0.022	0.019

* $P < 0.05$, compared to SF and GD groups; † $P < 0.05$, compared to TS and GDTS groups.

TABLE 5: Histopathologic Findings in Pancreatic Tissue – Median (min-max)

<i>Variables</i>	<i>SF</i>	<i>TS</i>	<i>GD</i>	<i>GDTS</i>	<i>TSGD</i>	<i>P</i>
<i>Edema</i>	1 (0-2)*	2 (0-3)	1 (0-3)	3 (2-4)	2 (1-4)	0.025
<i>Acinar Necrosis</i>	1 (0-2)†	4 (0-4)	1 (0-4)	4 (2-4)	4 (0-4)	0.011
<i>Parenchyma Hemorrhage</i>	1 (0-1)	2 (0-4)	0 (0-3)	1 (1-4)	2 (0-4)	0.262
<i>Fat Hemorrhage</i>	1 (1-2)	2 (1-4)	3 (0-4)	1 (0-4)	2 (1-4)	0.384
<i>Intralobular Infiltrate</i>	1 (0-1)‡	2 (1-4)	1 (1-2)	3 (1-4)	2 (1-4)	0.030
<i>Fat Necrosis</i>	0 (0-2)	1 (0-4)	0 (0-2)	3 (0-4)	1 (0-4)	0.146
<i>Perivascular Infiltrate</i>	0 (0-1)†	1 (1-4)	1 (1-2)	1 (0-4)	1 (1-4)	0.021
<i>Pancreatitis Score</i>	5 (1-11)‡	16 (6-22)	7 (4-18)	16 (8-28)	11 (6-26)	0.016

* $P < 0.05$, compared to GDTS group; † $P < 0.05$, compared to TS, GDTS and TSGD groups; ‡ $P < 0.05$, compared to TS and GDTS groups.

TABLE 6: Histopatologic Findings in Pulmonary Tissue – Median (min-max)

<i>Variables</i>	<i>SF</i>	<i>TS</i>	<i>GD</i>	<i>GDTS</i>	<i>TSGD</i>	<i>P</i>
<i>Intra-alveolar Edema</i>	1 (0-1)	1 (1-3)	1 (0-2)	1 (1-2)	1 (1-4)	0.136
<i>Intra-alveolar Hemorrhage</i>	1 (1-2)†	2 (1-3)	1 (0-1)*	2 (1-3)	3 (2-4)	0.001
<i>Neutrophilic Infiltrate</i>	0 (0-2)‡	2 (1-3)	1 (0-1)‡	1 (1-2)	2 (1-3)	0.005
<i>Pulmonary Lesion Score</i>	3 (1-4)‡	5 (3-8)	3 (0-4)‡	5 (3-6)	6 (4-9)	<0.001

* $P < 0.05$, compared to TS, GDTS and TSGD groups; † $P < 0.05$, compared to TSGD group; ‡ $P < 0.05$, compared to TS and TSGD groups.