



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E
FUNCIONAIS DO PULMÃO NO CURSO DA
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR CERULEÍNA.**

Cecília Mendes Morais

Fortaleza – Ceará

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Cecília Mendes Morais

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E
FUNCIONAIS DO PULMÃO NO CURSO DA
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR CERULEÍNA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

Fortaleza – Ceará

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M825a Morais, Cecília Mendes.
Avaliação das alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda induzida por ceruleína. / Cecília Mendes Morais. – 2013.
69 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Farmacologia da inflamação e do câncer.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
Coorientação: Prof. Dr. David Neil Criddle.
1. Pancreatite. 2. Ceruleína. 3. Lesão Pulmonar Aguda. 4. Mecânica Respiratória. I.
Título.

CECÍLIA MENDES MORAIS

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E
FUNCIONAIS DO PULMÃO NO CURSO DA
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR CERULEÍNA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
(Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará

**A Deus, Soberano Pai, Jesus Cristo,
Senhor e Salvador da minha vida,
por todas as bênçãos concedidas.
Aos meus pais, Gildenir e Lucimar, e
meu irmão Davi, pelo amor e apoio
incondicional.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. **Marcellus Henrique**, pela oportunidade de ingressar no laboratório, LAFICA.

Ao Professor Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares**, meu orientador, por ter me acolhido e confiado em mim; pela orientação científica e pessoal, pela dedicação e principalmente pela paciência.

Ao professor Dr. Armênio Aguiar dos Santos por ter aberto as portas do Laboratório Luis Capelo e disponibilizado toda estrutura necessária para o início dos experimentos.

Aos professores **Ricardo de Freitas e Emmanuel Prata**, pelos ensinamentos repassados e pela participação na minha banca de qualificação.

A Professora Dra. **Patrícia Rocco**, exemplo de profissionalismo, que me acolheu e ajudou no Rio de Janeiro para realização dos experimentos.

A todos os outros professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que contribuíram de alguma forma para a minha formação no mestrado.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação do laboratório LAFICA, **Renata Bessa**, que proporcionou grandes oportunidades acadêmicas e profissionais; **Deysen Girão, Priscilla Fernanda**, pelas conversas, pessoais e profissionais e pela grande amizade que o SENHOR fez nascer e nossos corações; **Álvaro Xavier e Fábio Bezerra**, sempre dispostos a me ajudarem e ensinar; **Ana Carla**, pela ajuda nas realizações dos primeiros experimentos, e em todo decorrer do trabalho.

Aos bolsistas, estudantes de iniciação científica do Laboratório LAFICA, **Luara Manuela, José Victor, Walber Mendes, Marina Rodrigues, Athayde**

Morais e Caio Lúcio, minha querida **equipe Delta**; não chegaria até aqui sem a contribuição de vocês.

A minha grande amiga **Milena Mendes**, companheira de todas as horas, desde a graduação, presente em todos os momentos, comemorando juntas os alegres e chorando juntas nos momentos difíceis. Verdadeiramente, existem amigos mais chegados do que irmãos. Pv 18:24.

As minhas amigas **Geórgia Gurgel, Maria Helena, Najla Angeline**, pois sei que torcem e oram por mim, se alegram com as minhas vitórias e estão dispostas a me ajudar a qualquer momento. Não importa a distância ou quanto tempo passamos sem nos falar, a amizade nunca muda.

Aos meus pais, **Gildenir e Lucimar**, pelo amor e apoio incondicional, dedicação, pela intercessão diante do SENHOR por mim, porque se realizam com a minha felicidade.

Ao meu namorado **Valdir Carvalho**, pelo companheirismo, apoio prático na realização da escrita desta dissertação, compreensão e incentivo, mesmo quando eu achei que não ia dar certo.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, especialmente **Aura e Márcia**, pela disponibilidade constante em ajudar.

Ao CNPq pelo suporte financeiro

A todos que direta ou indiretamente colaboraram em alguma etapa da execução do meu trabalho.

“Agora, pois, ó nosso Deus, graças te damos e louvamos o teu glorioso nome. Porque quem sou eu e quem é meu povo, para que pudéssemos oferecer voluntariamente coisas semelhantes? **Porque tudo vem de ti e das tuas próprias mãos te damos” I Cr29:15**

RESUMO

Avaliação das alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda induzida por ceruleína.

Introdução: A pancreatite aguda (PA) é considerada uma situação de emergência abdominal, na forma grave da doença os pacientes desenvolvem acentuada resposta inflamatória sistêmica e Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO). Um terço das mortes relacionadas com PA acontecem antes da admissão hospitalar, e a maior parte dos casos estão relacionados com lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). **Objetivos:** Avaliar as alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda experimental induzida por ceruleína. **Métodos:** PA foi induzida em Ratos Wistar, machos pesando 100-150g, pela administração de 4 doses de ceruleína (20µg/kg) com intervalo de uma hora e os grupos controle receberam apenas solução salina. Após 24 horas, os animais foram sedados, analgesiados e traqueostomizados e análise da função pulmonar foi realizada através da espirometria, onde foram avaliados Fluxo, Volume Corrente (VC), Frequência Respiratória (FR) e Volume Minuto (VM), e da mecânica pulmonar onde foram observados Elastância Dinâmica (Edin), Complacência Dinâmica (Cdin), Pressão de Pico, Resistência (Res). Lavado bronco-alveolar (LBA) foi realizado para contagem total e diferencial de células. Amostra de sangue arterial foi colhida para avaliação dos parâmetros gasométricos. Em seguida os animais foram sacrificados e níveis séricos de amilase, lipase, EPO, TNF- α , GRO-KC, MIP-1, VEGF, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18 e de malondialdeído (MDA) foram medidos. Atividade de mieloperoxidase (MPO) e avaliação histológica de pâncreas e pulmão foram determinadas. Além disso, amostras de sangue venoso foram colhidas para avaliação de translocação bacteriana. **Resultados:** Níveis séricos de amilase, lipase, citocinas, MDA e atividade de MPO pancreática e pulmonar estavam aumentados nos animais com PA; houve danos ao tecido pancreático e pulmonar, revelados na histologia, nos animais que receberam ceruleína, quando comparados ao grupo controle. O LBA dos animais tratados com ceruleína demonstrou maior quantidade de células, sendo predominantemente macrófagos. Gasometria arterial não apresentou diferença significativa entre os grupos. Fluxo, VC e VM se mostraram diminuídos nos animais com PA; FR permaneceu inalterada. Edin e Pressão de Pico estavam maiores e Cdin estava menor nos animais com PA e não houve alterações na Res. Estudo da bacteremia foi negativo em ambos grupos. **Conclusão:** Ceruleína induz PA em ratos com elevação dos níveis de amilase e lipase pancreática, com alterações histopatológicas no pâncreas e no pulmão dependente do infiltrado neutrofílico, radicais livres e citocinas inflamatórias. PA induz alterações espirométricas e na mecânica pulmonar que não são dependentes de processo infeccioso.

Palavras-chave: Pancreatite aguda. Ceruleína. Lesão pulmonar aguda. Mecânica respiratória.

ABSTRACT

Evaluation of inflammatory and functional lung in the course of acute pancreatitis induced by cerulein.

Introduction: Acute pancreatitis (AP) is considered an emergency abdominal, the severe form of the disease patients develop intense systemic inflammatory response and Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). About one-third of all deaths from acute pancreatitis has been reported to occur prior to admission to hospital, and in most cases, is associated with acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Objectives:** To assess the inflammatory and functional lung alterations in the course of AP induced by cerulein. **Methods:** Male Wistar rats (100-150g) were treated four times with one hour interval, intraperitoneally with cerulein (20 µg / kg, suspended in saline) or saline. Twenty-four hours after the first injection of cerulein, the animals were anesthetized, tracheostomized and placed in a spirometer for small animals and with following parameters evaluated: Flow, Volume(VC), Respiratory Frequency(RF) and Minute Volume(MV), and lung mechanics were observed where Dynamic Elastance (Edyn), Dynamic Compliance (Cdyn), Peak Pressure, Resistance (Raw). Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed to count and differential cell. Arterial blood sample was drawn for assessment of pulmonary gas exchange parameters. Then the animals were sacrificed and serum amylase, lipase, EPO, TNF-α, GRO-KC, MIP-1, VEGF, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18 and malondialdehyde (MDA) were measured. Myeloperoxidase activity (MPO) and histological evaluation of pancreas and lung were determined. In addition, venous blood samples were collected for evaluation of bacterial translocation. **Results:** Serum levels of amylase, lipase, cytokines, MDA and MPO activity of pancreatic and lung were increased in animals with PA, there was damage to pancreatic tissue and lung histology revealed, in animals that received cerulein compared to the control group. There was an increase in the number of BAL cells, predominantly macrophages. Arterial blood gas analysis showed no significant difference between groups. Flow, and MV proved lower in animals with PA; FR remained unchanged. Edyn and pressure peak were larger and Cdyn was lower in animals with PA and no changes in Res. There was no translocation in any groups. **Conclusion:** Cerulein induced AP in rats with elevated serum amylase and pancreatic lipase, with histopathological changes in the pancreas and lung dependent neutrophilic infiltrate, free radicals and inflammatory cytokines. PA induces spirometric and lung mechanics alterations that are not dependent on bacterial translocation.

Key words: Acute pancreatitis. Cerulein. Acute lung injury. Respiratory mechanics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Albumina Bovina Sérica
°C	Graus Celsius
CA	Califórnia
CCK	Colecistocinina
Cdin	Complacência Dinâmica
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
cmH ₂ O	Centímetros de Água
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPRE	Colangiopancreatografia Retrógrada Endoscópica
CXCL1	Quimiocina Ligante CXC 1
dL	Decilitro
Edin	Elastância Dinâmica
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPM	Erro Padrão da Média
EPO	Eritropoetina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Et al	E colaboradores
E.U.A	Estados Unidos da América
FiO ₂	Fração de O ₂ no ar inspirado
FR	Frequência respiratória
g	Gramas
GRO-KC	Oncogene Relacionado ao Crescimento – Quimiocina Derivada de Queratinócitos
h	Hora
I:E	Relação tempo inspiratório/expiratório
IFN- γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleucina 1 β

IL1ra	Antagonista da Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IP	Intraperitoneal
kg	Quilograma
LAFICA	Laboratório de Fisiologia da Inflamação e do Câncer
LBA	Lavado bronco-alveolar
LIP	Laboratório de Investigação Pulmonar
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPIV	Lesão pulmonar induzida por ventilador
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malonildialdeído
mg	Miligrama
MIP-1	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1
mL	Mililitro
mmol	milimol
MPO	Mieloperoxidase
nm	Nanometro
O ₂	Oxigênio molecular
p	Nível de significância
PA	Pancreatite Aguda
PaCO ₂	Pressão Parcial de CO ₂
PaO ₂	Pressão parcial de O ₂
PBS	Tampão Fosfato Salina
PE	Polietileno
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares

Res	Resistência das Vias Aéreas
rpm	Rotações por Minuto
SatO ₂	Saturação de O ₂
SDMO	Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
seg	Segundo
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
TC	Tomografia Computadorizada
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UI	Unidade Internacional
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VC	Volume Corrente
VCP	Ventilação Controlada a Pressão
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VM	Volume Minuto
VT	Volume Total
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
%	Porcento

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Evolução anatomo-clínica da PA
- Figura 2** Estrutura química da ceruleína
- Figura 3** Potenciais mecanismos de LPA decorrentes de PA
- Figura 4** Representação esquemática do sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas, utilizado para análise morfométrica dos pulmões
- Figura 5** Método e materiais utilizados para espirometria
- Figura 6** Fluxo pulmonar e sua relação com a dose de ceruleína
- Figura 7** Efeito da ceruleína sobre a atividade de amilase e lipase
- Figura 8** Comportamento da função pulmonar ao longo do tempo
- Figura 9** Efeito da ceruleína sobre a atividade de MPO pancreática e pulmonar e os níveis de MDA plasmático
- Figura 10** Contagem total de células no LBA
- Figura 11** Análise histológica da lesão pancreática
- Figura 12** Análise histológica da lesão pulmonar
- Figura 13** Efeito da ceruleína sobre a função pulmonar
- Figura 14** Mecânica pulmonar
- Figura 15** Bacteremia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Citocinas pro-inflamatórias

Tabela 2 - Parâmetros da gasometria arterial

Tabela 3 - Níveis plasmáticos das citocinas

Tabela 4 - Escores histológicos pulmonares na PA

Tabela 5 - Análise morfométrica

Tabela 6 - Avaliação da função pulmonar 6 horas após indução da PA

Tabela 7 - Avaliação da função pulmonar 12 horas após indução da PA

Tabela 8 - Avaliação da função pulmonar 18 horas após indução da

Tabela 9 - Avaliação da função pulmonar 48 horas após indução da PA

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1.Pancreatite	16
1.2.Pancreatite aguda	16
1.3.Pancreatite aguda induzida por ceruleína	21
1.4.Lesão pulmonar decorrente da pancreatite	22
2.OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1.Animais	27
3.2.Indução da pancreatite	27
3.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos na PA induzida por ceruleína	28
3.3.1 Avaliação da atividade de amilase e lípase.....	28
3.3.2 Gasometria arterial.....	28
3.4 Parâmetros inflamatórios.....	28
3.4.1 Avaliação da atividade de MPO.....	28
3.4.2 Avaliação da atividade de MDA.....	29
3.4.3 Lavado bronco-alveolar.....	29
3.3.4 Dosagem de citocinas plasmáticas.....	30
3.5 Análise histopatológica do pulmão e pâncreas	31
3.5.1 Morfometria.....	31
3.6 Parâmetros funcionais do pulmão.....	32
3.6.1 Espirometria.....	32
3.6.1 Mecânica pulmonar.....	33
3.7 Bacteremia.....	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Avaliação do fluxo pulmonar em relação a dose de ceruleína.....	35
4.2.Análise da atividade de amilase e de lípase.....	36

4.3. Avaliação da função pulmonar no curso temporal.....	38
4.4 Análise da gasometria arterial.....	38
4.5 Análise da atividade de MPO e MDA	39
4.6 Análise do infiltrado celular no LBA.....	41
4.7 Análise das citocinas plasmáticas.....	41
4.8 Análise histológica do pâncreas e pulmão	43
4.9 Avaliação da função pulmonar	45
4.10 Avaliação da mecânica pulmonar.....	47
4.11 Bacteremia.....	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE avaliação da função pulmonar, através da espirometria, as 6,12,18 e 48 horas após a indução de PA.....	67

1. Introdução

1.1 Pancreatite

Trata-se de um processo inflamatório pancreático, de aparecimento súbito (agudo) e etiologia variada, geralmente acompanhada de importante comprometimento sistêmico. Cessada a causa que desencadeou a inflamação, a enfermidade poderá evoluir para a regeneração do órgão, com recuperação clínica, anatômica e fisiológica ou, então, marchar para seqüelas decorrentes da cicatrização do parênquima. Em determinados casos pode provocar a morte (BANKS, FREEMAN, 2006). A doença é classificada como aguda, a menos que haja uma tomografia computadorizada (TC) ou achados de colangiopancreatografia endoscópica retrógrada (CPRE) que indiquem pancreatite crônica (BRADLEY, 1993). A pancreatite crônica é uma doença incurável, multifatorial em sua etiologia e altamente variável em sua apresentação (FELDMAN, 2010). A cronicidade e as freqüentes exacerbações afetam de modo substancial a qualidade de vida dos pacientes (OZA et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) vem há vários anos dedicando-se ao estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos em diversos modelos experimentais de pancreatite aguda, seja induzida por administração ceruleína, pela infusão de sais biliares no ducto pancreático o por álcool; também realizamos modelos de pancreatite crônica induzida por álcool. Nesse estudo nos deteremos a pancreatite aguda induzida por ceruleína e as possíveis repercussões inflamatórias e funcionais no pulmão decorrentes deste modelo.

1.2 Pancreatite aguda

A Pancreatite Aguda (PA) é considerada uma situação de emergência abdominal. A forma grave da doença é definida como quadro de PA acompanhada de disfunção orgânica importante e / ou presença de complicações locais (necrose, abscesso ou pseudocisto) (GUIMARÃES et al., 2009). O mecanismo patogênico da doença ainda não é totalmente elucidado,

sabe-se que ocorre uma desordem inflamatória do pâncreas exócrino caracterizada por edema pancreático, necrose acinar, hemorragia e necrose lipídica, assim como inflamação e infiltração perivasculares do pâncreas, podendo ainda atingir outros órgãos como fígado e pulmões (CRUZ et al., 2012; SAH et al., 2012).

Doenças digestivas pancreáticas atingem cerca de 50 mil pessoas por ano no Reino Unido, ocorrendo em taxas similares em todo o mundo, sendo que 70% dos casos são de PA, causando grande morbidade e mortalidade. Atualmente, a PA é a segunda causa de internação entre as doenças do trato gastrointestinal, sendo superada apenas pela colelitíase/colelístite nos E.U.A. No Brasil, a incidência é de 15,9 casos por ano para cada 100.000 habitantes (CAMPOS et al., 2008).

A PA pode ser subdividida em dois tipos: PA intersticial edematosa e PA necrotizante. A PA intersticial edematosa, geralmente um quando leve autolimitado é caracterizada por infiltrado de células inflamatórias e aumento do volume do pâncreas, devido edema; os sintomas geralmente desaparecem na primeira semana. Por sua vez, a PA necrotizante, envolve necrose do parênquima do pâncreas e do tecido peripancreático, e hemorragia. É a forma mais grave da doença, geralmente acompanhada de envolvimento sistêmico, apresentando maiores índices de complicações e mortalidade (BANKS et al., 2013; MACHADO et al., 2002).

A identificação do fator etiológico responsável pela PA é essencial, pois pode determinar o tratamento e sua eliminação pode levar a resolução do quadro ou a prevenção de um novo episódio (GUIMARÃES et al., 2009). A causa mais comum de PA, responsável por cerca de 30 a 50 % dos casos é a obstrução biliar, seguida do alcoolismo. Outras causas são: hereditariedade, hipertrigliceridemia, toxicidade medicamentosa, hipercalcemia, trauma abdominal, infecções, reações auto-imunes e isquemias. Acredita-se que coagulação intravascular e o tromboembolismo possuem um importante papel na patogênese da PA e estão relacionados com a sua gravidade. Apenas 10% dos casos não tem fator etiológico bem definido e são considerados idiopáticos (HAGIWARA et al., 2009; FRANCO et al., 2009).

Clinicamente, a PA pode ser diagnosticada nos pacientes com duas ou três das seguintes características: início súbito de dor abdominal superior;

níveis séricos de amilase e/ou lipase maiores do que três vezes o limite superior normal, achados na TC e/ ou ultra-sonografia abdominal com compatíveis de PA (BANKS et al., 2013). A dor geralmente tem irradiação dorsal e intensidade de moderada a forte, apresentando piora com alimentação ou uso de álcool. Em 90% dos casos é acompanhada de náuseas e vômitos. A hiperamilasemia é um marcador clássico da pancreatite, apresenta alta sensibilidade, mas é pouco específica, já que em diversas situações como insuficiência renal, perfuração esofágica e gravidez, poder haver aumento de amilase sem a presença de pancreatite. Mesmo em pacientes com PA, a dosagem de amilase pode estar normal, por exemplo, no diagnóstico tardio, já que os níveis de amilase tendem a se normalizar após alguns dias de evolução. Já a dosagem de lipase sérica é considerada o exame laboratorial primário para o diagnóstico da pancreatite, já que apresenta alta sensibilidade e especificidade e se mantém elevado por vários dias. Outros achados laboratoriais importantes são leucocitose e hiperglicemia moderada, como resultado da resposta inflamatória sistêmica. Pode haver também elevação discreta das transaminases hepáticas (GUIMARÃES et al., 2009).

Apesar da patogênese da pancreatite aguda não ser totalmente compreendida, alguns mecanismos são bem conhecidos: auto-digestão pancreática, distúrbios da microcirculação pancreática, ativação excessiva de leucócitos que leva a uma cascata de reações mediadas por citocinas e outros mediadores inflamatórios, além da translocação de bactérias do intestino para o tecido pancreático. Ativação intra-acinar prematura de enzimas digestivas é um evento-chave na patogênese da PA, sendo as principais enzimas envolvidas: a tripsina, a quimiotripsina, a elastase e a fosfolipase A, que são enzimas proteolíticas que escapam do grânulo do zimogênio, lesando a célula acinar pancreática (MELO et al., 2011; ZHANG et al., 2009)

Zhou et al., 2010, descrevem a evolução da PA grave, onde ocorre um primeiro estímulo nocivo, que resulta em uma pronunciada Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) e o desenvolvimento potencial de Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), e no pior dos casos a mortalidade precoce. Mais tarde, durante o curso da PA, os autores consideram como segundo estímulo a combinação da disfunção de órgãos e

infecção, que pode ser devido translocação bacteriana do intestino e pode resultar em mortalidade tardia (Figura 1).

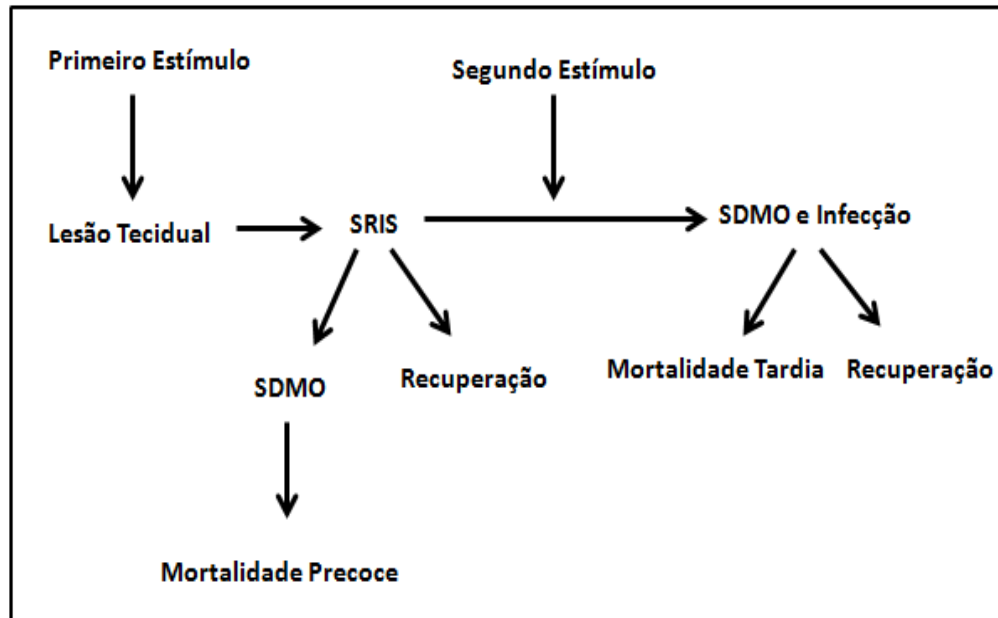


Figura 1- Evolução anatomo-clínica da PA. Fonte: Adaptado de Zhou e cols (2010)

Outro evento é a liberação de mediadores inflamatórios pela célula acinar, substâncias vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular e contribuem para formação de edema. A resposta imediata dos mediadores inflamatórios, como citocinas e sistema complemento, estimulam a migração de outras células inflamatórias, principalmente neutrófilos, que amplificam as alterações locais, aumentando o dano pancreático (MORETTI, 2007). Uma fase posterior envolve eventos extra-acinares, com lesão de outros órgãos. Nesta fase, os mediadores inflamatórios têm um papel importante na determinação da lesão pancreática e extrapancreática, em especial no pulmão (DE LA MANO et al., 2004; SEVILLANO et al., 2003).

Browne, Pitchumoni, 2006, relatam algumas das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório da PA e suas possíveis funções nesta patologia (Tabela 1).

Tabela 1- Citocinas pró-inflamatórias

Citocinas	Funções
IL-1β	Importante mediador inflamatório, ativador de macrófagos e aumenta a ativação de células B e T.
IL-6	Estimula a diferenciação de células B, importante mediador de fase aguda.
IL-8	Indução de moléculas de adesão, fator quimiotático de neutrófilos e linfócitos.
TNF-α	Recrutamento de células inflamatórias, regulação da produção de outras citocinas, causa morte de células acinares por apoptose.

Fonte: Adaptado de Browne, Pitchumoni (2006).

Vários estudos experimentais, utilizando diversos modelos de indução de PA, seja por ceruleína, infusão de taurocolatos de sódio ou dieta deficiente de colina e suplementada com etionina, têm sugerido que a PA é uma doença dividida em três fases. A fase inicial é caracterizada pela ativação de enzimas digestivas pancreáticas e lesão das células acinares, que envolve as primeiras horas da PA. Na segunda fase ocorre uma reação inflamatória intrapancreática e graus variáveis de necrose das células acinares, em torno de 12 – 72 após o insulto inicial. Na terceira fase, ocorre uma progressão da lesão do pâncreas e o aparecimento de alterações extrapancreáticas, tais como Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (BROWNE, PITCHUMONI, 2006).

A maioria dos pacientes com pancreatite sofre de uma doença leve e auto-limitada, mas 15-20% dos pacientes desenvolvem a forma grave da doença, com ocorrência da SRIS e SDMO. A mortalidade durante as duas primeiras semanas de PA é geralmente devido a falência de múltiplos órgãos, após esse período é resultado de infecção secundária do pâncreas ou necrose peripancreática (ZAHEER et al., 2013).

Entre os principais componentes da SDMO decorrente de PA incluem-se: insuficiência cardíaca, falência renal, hepática e respiratória, sendo esta

última a mais comum e potencialmente mais grave, devido ao desenvolvimento de LPA e da SDRA (MUHS et al., 2003). PA associada a SDRA e subsequente falência de múltiplos órgãos ocorre em 10 a 20% dos pacientes, sendo responsável por 60% das mortes (ELDER et al., 2011).

A determinação da gravidade da PA no momento do seu diagnóstico é fundamental no seu tratamento, já que permite a identificação precoce das complicações, a triagem de pacientes para tratamento em Terapia Intensiva e define as decisões terapêuticas. A base para o tratamento da PA é o suporte clínico e a suspensão da ingestão de alimentos, já que ainda não há tratamento específico para a doença. Este suporte clínico consiste na manutenção da perfusão tecidual, através da reposição volêmica vigorosa, manutenção da saturação de oxigênio, analgesia e suporte nutricional (GUIMARÃES et al., 2009).

1.2 PA induzida por ceruleína

A ceruleína, um análogo da colecistocinina (CCK), promove uma alteração histológica muito semelhante à fase inicial da PA em humanos, agindo através de receptores da CCK, estimulando de forma exagerada as células acinares. Ocorre uma secreção máxima das enzimas digestivas; a ativação da tripsina intracelular pode ativar o tripsinogênio e outros zimogênios, iniciando uma série de eventos ativados por proteases. As enzimas digestivas, uma vez ativadas, degradam proteínas celulares, incluindo proteínas estruturais, o que leva a uma autodigestão pancreática (LUNOVA et al., 2012; CHAN, LEUNG, 2007).

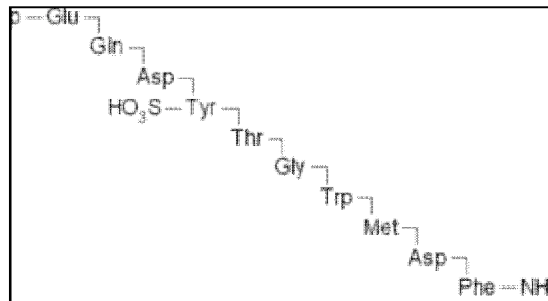


Figura 2- Estrutura química da ceruleína. Fonte: Sigma- Aldrich

A PA induzida por ceruleína é o modelo experimental mais amplamente utilizado por ser rápido, não invasivo e reprodutível, podendo induzir PA em camundongos, ratos, coelhos, cães e porcos, nos quais ocorre PA intersticial (CHAN, LEUNG, 2007; LEE et al., 2007).

Após 24 horas da indução de PA pela administração de ceruleína, observam-se danos ao tecido pancreático, caracterizados por infiltrado de células inflamatórias, vacuolização, depleção dos grânulos de zimogênio, necrose de células acinares e edema. Além disso, há alteração em parâmetros laboratoriais, tais como aumento da amilase e lipase séricas, aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) pancreática e aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β (MALLEO et al., 2008).

1.3 Lesão pulmonar decorrente da PA

O pulmão é o principal órgão responsável pelas mortes nos indivíduos com PA, devido ao desenvolvimento de LPA e de SDRA. Cerca de 60% dos pacientes com PA desenvolvem complicações pulmonares, que podem variar desde uma leve hipoxemia até a SDRA. (CHOOKLIN et al., 2009). Estas complicações são responsáveis por até 60% das mortes na primeira semana da doença (MUHS et al., 2003).

A SDRA geralmente se manifesta entre dois e sete dias após o início de PA, contudo pode haver um curso muito mais rápido. As características clínicas da doença incluem dispnéia severa e hipoxemia refratária a uma alta concentração de oxigênio inspirado. Estudos em autópsias de pacientes com PA têm demonstrado alterações morfológicas nos pulmões que são indistinguíveis dos pacientes que desenvolvem SDRA por outro motivo, incluindo choque séptico e trauma grave. Embora menos freqüente do que nos pacientes com pancreatite necrosante, os pacientes com pancreatite edematosa intersticial também possuem risco de desenvolver insuficiência respiratória (BROWNE, PITCHUMONI, 2006).

Normalmente, o epitélio pulmonar é asséptico, formado apenas por macrófagos no interior dos espaços alveolares. A principal característica da LPA é o infiltrado neutrofílico e o aumento da permeabilidade alvéolo-capilar. A infiltração neutrofílica é um evento precoce, secundário à liberação de

mediadores inflamatórios. Através do afluxo de células inflamatórias, as proteases (elastase e colagenase, por exemplo) são liberadas no tecido pulmonar, acarretando grave lesão tecidual. Além disso, os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (ERO), que aumentam a lesão tecidual, e outras enzimas, como a ciclooxygenase e a lipoxigenase, que ao entrarem em contato com ácidos graxos livres promovem a liberação de prostaglandinas e leucotrienos, produzindo vasoconstrição e broncoconstrição (ROCHA et al., 2007).

Duas fases distintas de LPA e SDRA têm sido descritas. Inicialmente uma fase exsudativa, durante os primeiros dias, com dano alveolar difuso, lesão microvascular, necrose de pneumócitos tipo II, afluxo de células inflamatórias e fluidos para o interstício pulmonar. Em seguida ocorre uma fase fibro-proliferativa nos 3 a 7 dias seguintes, onde ocorre hiperplasia dos pneumócitos, proliferação de fibroblastos e reparação pulmonar. Vários são os mediadores envolvidos, incluindo citocinas e quimiocinas e grande variedade de células que regulam a migração e infiltração de neutrófilos para o tecido intersticial (ZHOU et al., 2010).

A figura 2 mostra os potenciais mecanismos da LPA decorrente de PA, incluindo disfunção da barreira endotelial, com extravasamento de líquidos e células inflamatórias para o interior dos alvéolos (ZHOU et al., 2010).

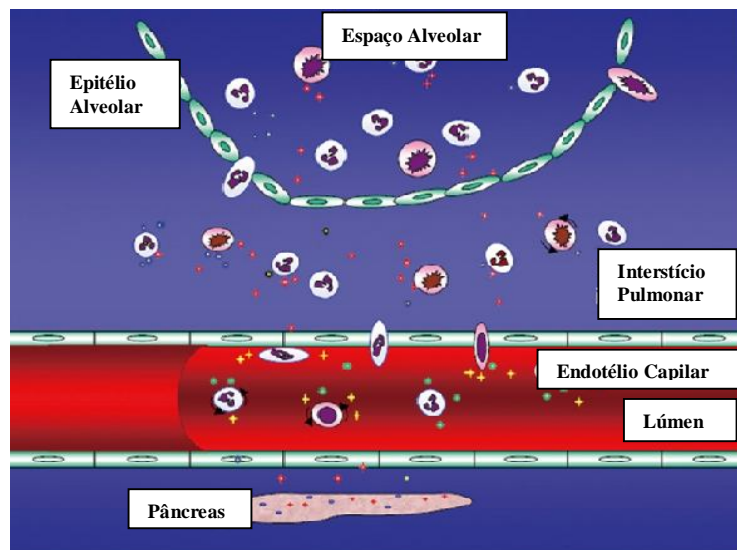


Figura 3 – Potenciais mecanismos de LPA decorrente de PA. Fonte: Zhou e cols (2010)

Durante LPA e SDRA, citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas, como TNF- α , MIP-1, IL-2, IL-6, IL-17, IL-18, INF γ , atraem neutrófilos para o pulmão; estes, quando ativados, juntamente com os macrófagos residentes, induzem uma cascata inflamatória. Essa cascata estimula ainda mais a quimiotaxia de neutrófilos e promove uma exarcebação da lesão pulmonar, com apoptose e necrose de células epiteliais. O dano epitelial promove aumento da permeabilidade da membrana alveolo-capilar, com conseqüente afluxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos, o que pode causar inativação do surfactante. Todo esse processo inflamatório induz alteração alveolar grave, com infiltrado exsudativo, colapso alveolar e queda da complacência pulmonar, prejudicando a troca de gases e levando a deterioração da função pulmonar (ELDER et al., 2012; ROCHA et al., 2007).

Portanto, LPA / SDRA, se apresentam como dois dos principais problemas clínicos decorrentes de PA, mas os estudos sobre esta área permanecem escassos. Um número limitado de modelos invasivos de PA, como a infusão de taurocolato de sódio no ducto biliar, tem sido utilizado para avaliar as mudanças na função pulmonar resultante da PA, através da mecânica pulmonar. A mecânica pulmonar mensura as alterações pulmonares através da medição de parâmetros relativos a elasticidade e rigidez do pulmão (ELDER et al., 2011).

Outra maneira de se avaliar a funcionalidade pulmonar é através da espirometria, que permite medir o volume de ar inspirado e expirado e os fluxos respiratórios. A espirometria é um exame que auxilia na prevenção e diagnóstico dos distúrbios ventilatórios e permite a quantificação dos mesmos. Deve, portanto, ser parte integrante da avaliação de pacientes com sintomas respiratórios ou com doenças respiratórias já conhecidas (PEREIRA, 2002).

1.4 Justificativa

A ocorrência de LPA associada a PA já está bem estabelecida em estudos clínicos e experimentais (PASTOR et al., 2003). Apesar de a lesão pulmonar ser a complicação mais freqüente e a principal causa de morte nos pacientes com PA, a fisiopatologia deste evento, os mediadores e as vias inflamatórias envolvidas não estão completamente elucidados. Além disso,

existem muitas controvérsias em relação aos modelos experimentais de indução de PA quanto à avaliação das complicações inflamatórias e poucos estudos relacionam PA induzida por ceruleína e avaliação da função pulmonar. No presente trabalho, visamos analisar o modelo experimental de PA induzida por ceruleína e identificar os mediadores inflamatórios envolvidos na lesão pancreática e pulmonar, bem como de que forma esses mediadores interferem na funcionalidade pulmonar.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar as alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda experimental induzida por ceruleína;

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as alterações bioquímicas decorrentes da PA induzida por ceruleína, através da atividade de amilase e lipase e gasometria arterial;
- Avaliar aspectos inflamatórios do pulmão e do pâncreas através da mensuração da atividade de Mieloperoxidase (MPO); de Malonaldeído (MDA), infiltrado de células no lavado bronco-alveolar (LBA);
- Observar as alterações histopatológicas do pulmão e do pâncreas no curso da pancreatite experimental;
- Estudar o envolvimento das citocinas plasmáticas nas lesões pancreáticas e pulmonares no curso da pancreatite experimental;
- Pesquisar a ocorrência de alterações funcionais do pulmão, analisadas através da mecânica pulmonar e da espirometria;
- Realizar estudo bacteriológico no modelo de PA induzida por ceruleína.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando 100-150g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), os quais foram mantidos em gaiolas, sob condições de temperatura e umidade, sendo oferecido ração balanceada e água em quantidades controladas, e permaneceram nas mesmas condições durante os demais dias experimentais. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (protocolo 88/11). Os experimentos foram conduzidos no LAFICA - UFC

3.2 Indução da pancreatite

Os animais foram separados em três grupos, conforme o esquema de administração de ceruleína (Sigma- Aldrich) diluída em salina. Em um dos grupos, os animais foram submetidos a quatro administrações intraperitoneais (IP) de 20µg/kg da droga. Nos outros dois grupos, para avaliar possível relação entre a dose total de ceruleína e a gravidade da PA, foram administradas doses maiores da droga: no primeiro, sete administrações de 20µg/kg; no segundo, nove administrações de 50µg/kg. Estabeleceram-se, ainda, três grupos nos quais os animais foram tratados apenas com salina e alocados conforme submetidos a quatro, sete ou nove administrações desta solução. Em todos os grupos, manteve-se fixo o volume de 300µL por infusão em cada animal e intervalo de uma hora entre elas. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, amostras de sangue foram colhidas para análises bioquímicas, os animais foram sacrificados e amostras de pâncreas e pulmões foram coletados para análise histológica e avaliação da atividade da MPO.

3.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos na PA induzida por ceruleína

3.3.1 Avaliação da atividade de amilase e lipase

A atividade de amilase e lipase séricos foram mensurados às 6, 12, 24 e 48 horas após a primeira administração de ceruleína. Foram determinados pelo método colorimétrico enzimático, usando um kit comercial, de acordo com as instruções descritas pelo fabricante (Labtest DiagnósticoSA, Lagoa Santa, Brasil) e expressos como UI/dL.

3.3.2 Gasometria arterial

Após 24 horas da primeira administração de ceruleína, os animais foram anestesiados (Uretano, 6mL/100g Sigma- Aldrich®) e um cateter de polietileno (PE-10) foi introduzido na artéria carótida direita para coleta de amostras de sangue arterial. Logo em seguida 300µL das amostras foram colocadas no analisador de gases (Cobas b 121, Roche®), para obtenção de valores de pH (potencial hidrogeniônico), PaO₂ (pressão parcial de oxigênio), PaCO₂ (pressão parcial de gás carbônico) e SatO₂ (saturação de O₂).

3.4 Parâmetros inflamatórios na PA induzida por ceruleína

3.4.1 Avaliação da atividade de MPO no pulmão e no pâncreas

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Resumidamente, 50 mg de tecido (base do pulmão esquerdo ou pâncreas) de cada animal foi utilizado. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio e dianosidine como substrato para a MPO. A unidade da atividade

de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto (BRADLEY et al., 1982).

3.4.2 Avaliação da atividade de malondialdeído plasmático (MDA)

Essa técnica foi descrita por Ohkawa e cols (1979). Baseia-se na medida dos níveis de malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o complexo de coloração rosa (cromóforo) que pode ser quantificado em espectrofotômetro. O complexo formado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente usado como biomarcador de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. A peroxidação lipídica foi analisada no plasma utilizando os níveis de MDA como índice. Uma alíquota (50µL) do plasma foi adicionado 200 µL de duodecil sulfato de sódio 8,1% e 1,5 mL de ácido acético 20%, o pH da solução foi ajustado para 3,5. Foram adicionados ainda 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e quantidade de água destilada suficiente para completar volume final de 4 mL. Todas as amostras foram colocadas em banho-maria, a 95° C, durante 1 h. Após resfriamento da amostra, foi adicionado 1 mL de água destilada e 5 mL de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica mensurada 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/ml.

3.4.3 Lavado bronco-alveolar (LBA)

Vinte e quatro horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram anestesiados (Uretano 0,6ml/100g Sigma-Aldrich®), traqueostomizados e foi realizada a lavagem dos pulmões administrando-se três alíquotas diferentes de PBS diretamente na traquéia do animal e em seguida retirada, delicadamente. As amostras de LBA foram centrifugados a 600 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado e o sedimento de células foi ressuspenso em solução de PBS com albumina bovina sérica (BSA); 20µl dessa solução foi diluída em solução de Turk e utilizada para fazer contagem total de infiltrado celular na câmara de Neubauer. 60µl da solução foi

utilizada para corar lâminas em hematoxilina-eosina para contagem diferencial das células do infiltrado, que foi realizado em um microscópio óptico em uma magnificação de 400x, pelo morfolologista Pedro Marcos Gomes Soares, do Departamento de Morfologia, da UFC.

3.4.4 Dosagem de citocinas plasmáticas

Vinte e quatro horas após a primeira administração de ceruleína, os níveis de citocinas no plasma foram medidos utilizando um sistema de ensaio de citocinas multiplex Bioplex (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA), que permite quantificar múltiplos biomarcadores em um único poço, em uma placa de 96 poços. O princípio do ensaio é similar ao método ELISA. Anticorpos dirigidos contra o biomarcador desejado são covalentemente acoplados as *beads* magnéticas que reagem com as amostras contendo o biomarcador de interesse. Após séries de lavagens, um anticorpo bionitilado de detecção é adicionado para criar um complexo. O complexo de detecção final é formado com a adição de Streptavidina-PE, que serve como um indicador de fluorescência. Resumidamente, 50µL das *beads* foram colocadas nos poços da placa, a placa foi lavada em lavadora apropriada com 100µL de tampão de lavagem. Em seguida 50µL padrão, das amostras e do “branco” são colocados na placa, que é incubada no escuro, durante uma hora à 300 rotações por minuto (rpm). Adicionou-se 25µL do anticorpo de detecção e a placa foi incubada novamente a 300 rpm, por 30 min. Mais uma lavagem foi realizada mais e, finalmente, 50µL de estreptavidina-PE foi adicionado em cada poço e após 10 minutos de incubação e lavagem, as *beads* foram novamente suspensas em 125µL de tampão de ensaio e incubadas a 1100 rpm por 30 segundos. Logo em seguida foi realizada a leitura da placa à 635 e 532 nm através do sistema Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando o Bio-Plex Software Manager (versão 3.0, Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA). Doze citocinas / quimiocinas foram analisadas : EPO, TNF- α , GRO-KC, MIP-1, VEGF, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18.

3.5 Análise histopatológica do pâncreas e do pulmão

Amostras de pâncreas e do pulmão foram retiradas, fixadas em formol a 10%, e álcool a 70% embebidas em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5 μm , com auxílio de um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. As alterações morfológicas características de pancreatite avaliadas foram edema, infiltração de polimorfonucleares (PMN) e necrose de células acinares; as alterações avaliadas no pulmão foram edema alveolar, infiltração de PMN e espessamento alveolar. Os escores variaram de 0 a 3, sendo 9 o escore máximo (GULTEKIN et al.,2007). Os dados foram avaliados sob microscopia, em um estudo cego, pelo morfologista Pedro Marcos Gomes Soares, do Departamento de Morfologia, da UFC.

3.5.1 Morfometria

A análise morfométrica dos pulmões foi realizada usando-se uma ocular acoplada a um microscópio de luz (Olympus BX51, *Olympus Latin America-Inc.*, Brasil) contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas (de comprimento conhecido) dispostas em paralelo (Figura 3). As frações de área do pulmão ocupadas por alvéolos colapsados ou normais ou hiperinsulados (maiores do que 120 μm) foram determinadas pela técnica de contagem de pontos (WEIBEL, 1990) em um aumento de 200x. Foram analisados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina.

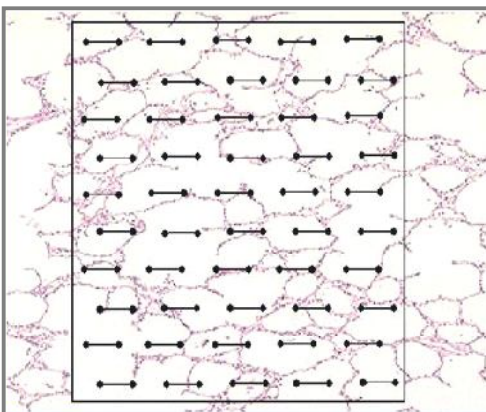


Figura 4-Representação esquemática do sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas, utilizado para análise morfométrica dos pulmões.

3.6 Parâmetros funcionais do pulmão

3.6.1 Espirometria

A análise da função pulmonar foi realizada as 6, 12, 18, 24 e 48 horas após a primeira injeção de ceruleína. Os animais foram anestesiados (Uretano, 0,6ml/100g Sigma- Aldrich®), traqueostomizados e colocados em um espirômetro para pequenos animais (AD Instruments®, Sidney, Austrália), onde permaneceram por dez minutos e os seguintes parâmetros foram avaliados: Fluxo, Volume Corrente (VC), Frequência Respiratória (FR) e Volume Minuto (VM); os dados foram obtidos e analisados através do software LabChart® (Figura 4).

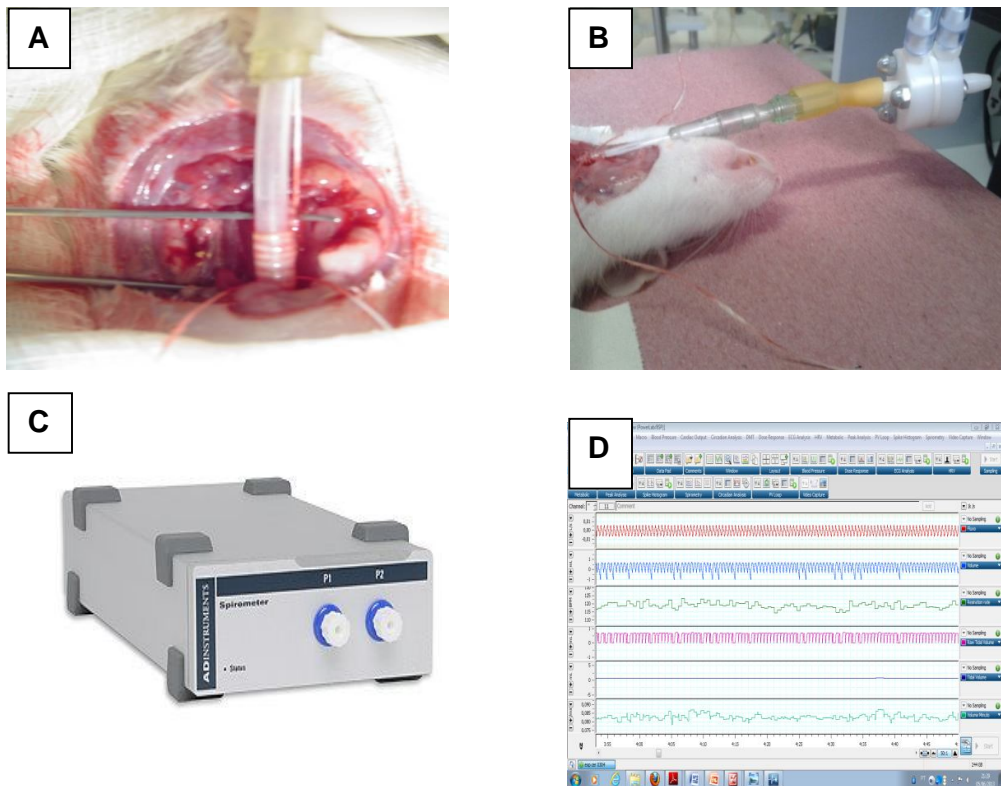


Figura 5- Método e materiais utilizados para espirometria (A)- Animal traqueostomizado; (B)- Animal traqueostomizado conectado ao sensor de fluxo; (C)- Espirômetro para pequenos animais, ADinstruments®; (D)- Software LabChart®, onde os dados foram analisados

3.6.2 Mecânica pulmonar

Para análise da mecânica pulmonar, os animais de outro grupo foram sedados (Xilazina, 2,5 mg /kg ip) e anestesiados (Ketamina 0,75 mg /kg ip), colocados em uma pequena placa (FEP421, INSIGHT®, Brasil), a 38°C, a fim de mantê-los em temperatura adequada. Os animais foram então traqueostomizados e posteriormente, um cateter de polietileno (PE-10) foi introduzido na artéria carótida direita para coleta de amostras de sangue arterial. Foi realizado relaxamento muscular com brometo de pancurônio intravenoso a uma dose de 2 mg/kg e os animais foram submetidos à ventilação mecânica (VM) (Servoi, MAQUET®, Suíça), no modo VCP com um Volume Total (VT) = 6ml / kg, volume minuto = 160ml / min, relação tempo inspiratório-expiratório = (I:E)=1:2, FiO₂= 0,4, e com a pressão expiratória final de 3 cmH₂O, para a coleta das variáveis da mecânica pulmonar: Pressão de Pico, Elastância dinâmica (Edin), Complacência dinâmica (Cdin) e Resistência das vias aéreas (Res). Esse experimentos foram realizados em colaboração com a professora Patrícia Rocco, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas, no Laboratório de Investigação Pulmonar (LIP), na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.7 Bacteremia

Amostras de sangue dos animais foram colocadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) um meio de cultura, composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, peptona e dextrose, utilizado para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Possui coloração original amarela e límpida e a turvação é indicativa de crescimento bacteriano. 48 horas após a incubação do sangue no meio de cultura, as amostras foram analisadas pela professora Cibele Barreto Mano de Carvalho, experiente microbiologista, no Laboratório de Bacteriologia, do Centro de Biomedicina, na UFC.

3.8 Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal) ou como mediana \pm mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal). A análise estatística foi feita usando o teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni quando apropriado. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Significância estatística foi observada quando $p < 0,05$. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software Prism versão 5.03 da GraphPad Software.

4. Resultados

4.1 Avaliação do fluxo pulmonar em relação a dose de ceruleína na PA.

Na literatura existem vários modelos de PA induzida por ceruleína, com diferentes doses e tempos de administração, e que relacionam essas doses com a gravidade da PA. Em virtude da não padronização desse aspecto, avaliamos a função pulmonar, através da espirometria, em três grupos de animais tratados com diferentes doses ceruleína. No primeiro grupo utilizamos a dose de 4 administrações com 20µg/kg e observamos uma diminuição do fluxo pulmonar no grupo com PA (14.41 ± 0.56), quando comprado ao grupo controle (18.19 ± 0.01). No segundo grupo foi utilizada a dose de 7 administrações com 20µg/kg e também foi observada diminuição do fluxo pulmonar nos animais ceruleína (22.01 ± 0.79) quando comparados ao animais salina (27.31 ± 1.53). No terceiro grupo utilizamos a dose de 9 administrações com 50µg/kg e foi observada diminuição do fluxo pulmonar no grupo tratado com ceruleína (19.78 ± 1.23) quando comparado ao grupo de animais tratados com solução salina (24.75 ± 2.46). Em todos os grupos avaliados observou-se redução em torno de 20% do fluxo pulmonar. Portanto optamos por utilizar a dose de 20µg/kg com 4 administrações em todos os outros experimentos (figura 6).

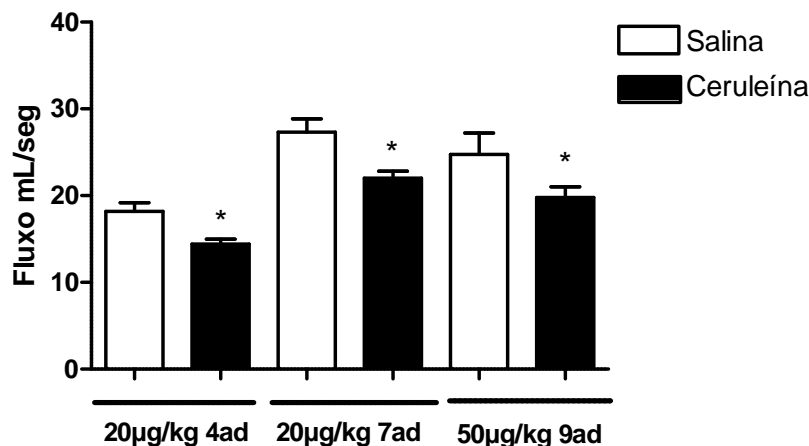


Figura 6 - Fluxo pulmonar e sua relação com a dose de ceruleína. Três grupos de animais foram tratados, o primeiro com 4 administrações de 20µg/kg cada, o segundo com 7 administrações de 20µg/kg e o terceiro com 9 administrações de 50µg/kg. 24 horas após a primeira administração, os animais foram submetidos a espirometria, para análise da função pulmonar. Observamos redução em torno de 20% do fluxo pulmonar em cada dose analisada. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.2 Análise da atividade de amilase e lipase

A atividade de amilase e lipase foram mensurados as 6, 12, 24 e 48 horas após a indução de PA com a dose de 4 administrações com 20µg/kg de ceruleína. Os níveis séricos de amilase e lipase foram aumentados em todos os tempos observados em relação ao grupo controle (salina), exceto às 48 horas. Foram observados picos de amilase as 6 (7890 ± 45.2), 12 (8251 ± 22.9) e 24 (5863 ± 73.2) horas, quando comparados ao grupo salina as 6 (2057 ± 45.2), 12 (2561 ± 45.4) e as 24 (2891 ± 29.3) horas. As 48 horas os valores de amilase do grupo ceruleína (3254 ± 620) foram comparáveis aos do grupo salina (2648 ± 11.2). Da mesma forma, picos de lipase foram observados no grupo ceruleína as 12 (56.36 ± 9.69) e 24 (113.9 ± 19.1) horas, quando comparado ao grupo salina. Diferente da amilase, os níveis de lipase do grupo ceruleína ainda permaneceram altos as 48 horas (29.59 ± 4.9), quando comparados com o grupo salina (11.11 ± 2.5) (figura 7).

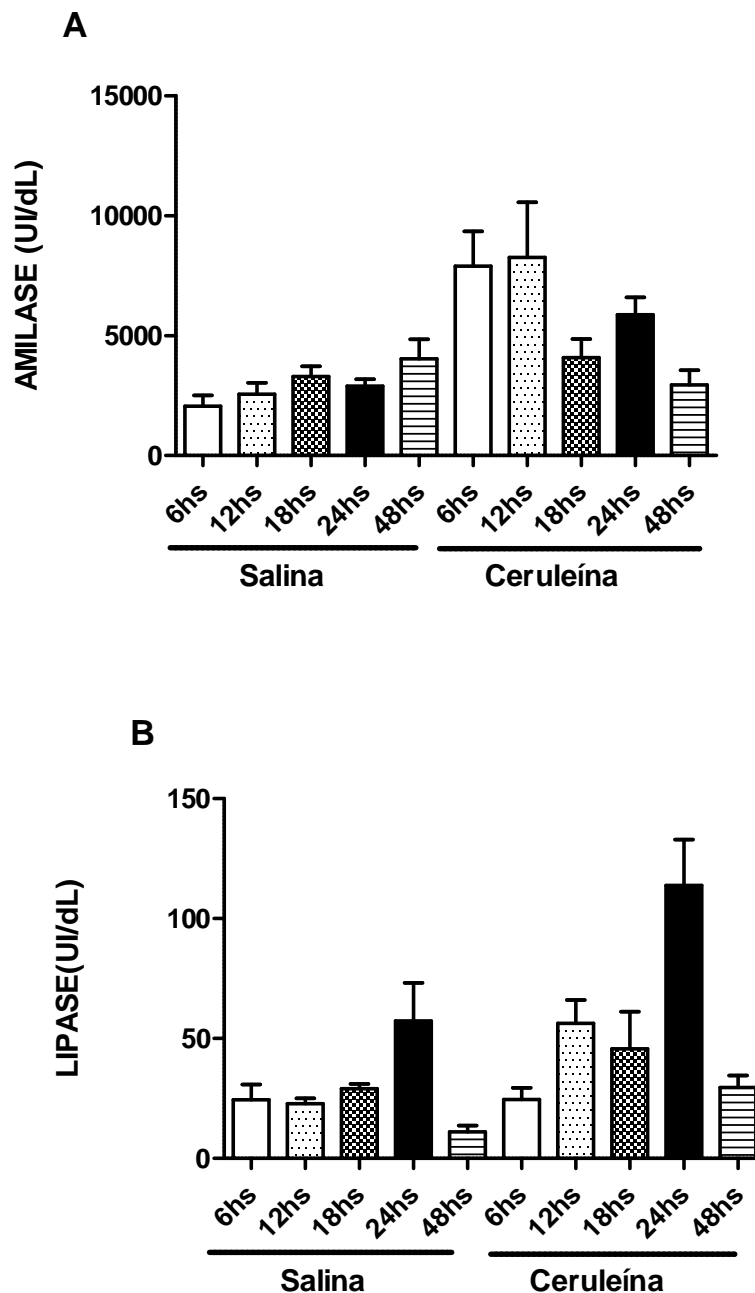


FIGURA 7- Efeito da ceruleína sobre a atividade de amilase e lipase. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 6, 12, 24 e 48 horas após a primeira administração de ceruleína, amostras de sangue foram obtidas para análise da atividade de amilase e lipase. (A) - Foram encontrados níveis aumentados de amilase às 6, 12 e 24 horas, com redução as 48 horas. (B) - Altos níveis de lipase foram encontrados às 12, 24 e 48 horas. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.3 Avaliação da função pulmonar no curso temporal da PA

Em virtude da observação de picos de amilase às 6, 12 e 24 horas e de lipase as 12 e 24 horas, decidimos avaliar o melhor período para avaliação da função pulmonar, através da espirometria. A espirometria foi realizada as 6, 12, 18, 24 e 48 horas após a primeira administração de ceruleína, onde utilizamos o fluxo pulmonar como parâmetro, pois todas as outras variáveis são derivadas do mesmo. Observamos uma queda do fluxo às 24 horas, que retornou aos valores de normalidade as 48 horas (figura 8). Portanto, optamos em fazer todos os outros experimentos após 24 horas da primeira administração de ceruleína.

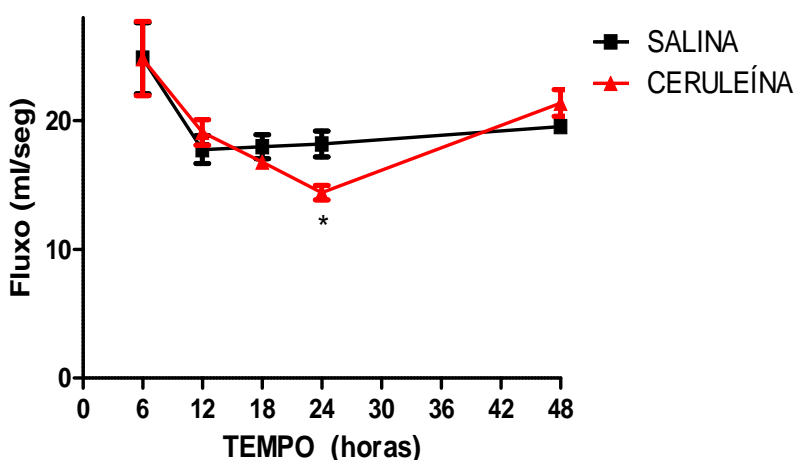


Figura 8 - Comportamento da função pulmonar ao longo do tempo. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20 μ g/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 6,12, 18, 24 ou 48 horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram submetidos à espirometria para avaliação da função pulmonar. Observou-se um queda do fluxo às 24 horas, retornando aos valores de normalidade às 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. $p < 0,05$ Salina x Ceruleína. Anova seguido de Bonferroni.

4.4 Análise da gasometria arterial

Não houve diferenças significativas nos gases arteriais dos animais com PA em relação aos animais controle (Tabela 2).

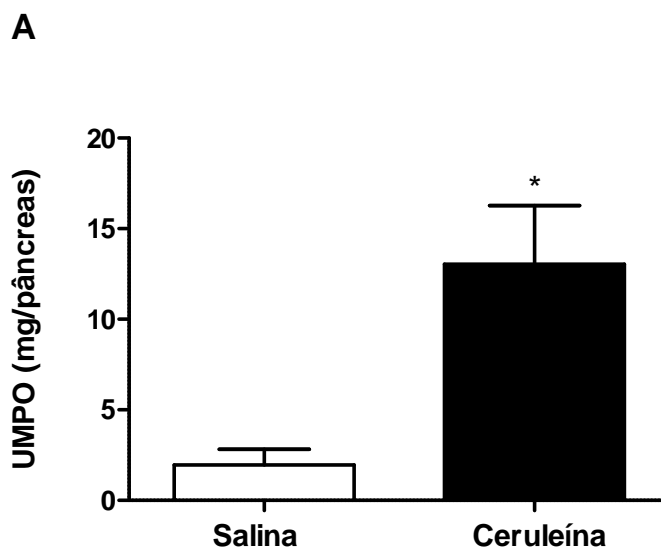
Tabela 2 - Parâmetros da gasometria arterial

PARÂMETRO	SALINA	CERULEÍNA
pH	7.39 ± 0.01	7.41 ± 0.09
PaO ₂	98.23 ± 3.05	101.1 ± 1.94
PaCO ₂	41.74 ± 1.36	41.88 ± 1.14
SatO ₂	92.56 ± 1.09	93.53 ± 0.27

PaO₂ e PaCO₂ em mmHg. Sat O₂ em percentual. Os valores representam a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. T teste não pareado.

4.5 Análise da atividade de MPO pancreática e pulmonar e MDA plasmático.

Foi observado aumento da atividade de MPO no pâncreas dos animais com PA (13.04 ± 3.2) quando comparados aos animais do grupo salina (1.96 ± 0.85). Da mesma forma, a atividade de MPO encontrou-se elevada no pulmão dos animais tratados com ceruleína (12.40 ± 3.5) quando comparados aos do grupo controle (3.54 ± 0.8). Níveis plasmáticos de MDA, marcador de estresse oxidativo, também mostrou-se elevado no grupo ceruleína (30.61 ± 5.8) quando comparado ao grupo salina (13.29 ± 3.2) (figura 9).



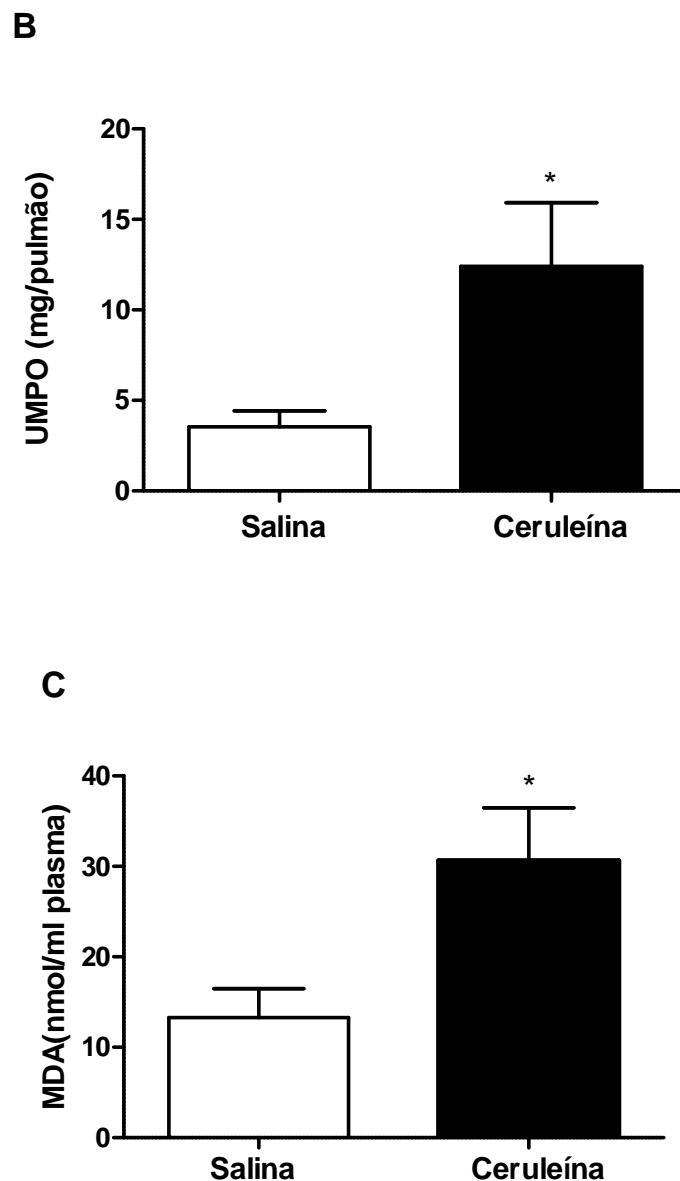


Figura 9 - Efeito da ceruleína sobre a atividade de MPO pancreática e pulmonar e sobre os níveis de MDA plasmático. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, plasma foi obtido para mensuração dos níveis de MDA, os animais foram sacrificados e amostras de pâncreas e pulmão foram obtidas para análise da atividade de MPO. Atividade de MPO no pâncreas (A) e no pulmão (B) mostraram-se elevadas e os níveis de MDA plasmático (C) também foram aumentados nos animais com PA. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. *p<0,05 Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.6 Análise do infiltrado celular no LBA na PA

Houve um aumento na contagem total de células de 1,68 vezes no LBA do grupo ceruleína quando comparado ao grupo salina (Figura 10). As células encontradas foram predominantemente macrófagos, seguidos de eosinófilos e neutrófilos. No grupo salina também foram encontrados macrófagos, contudo, nenhum neutrófilo foi encontrado.

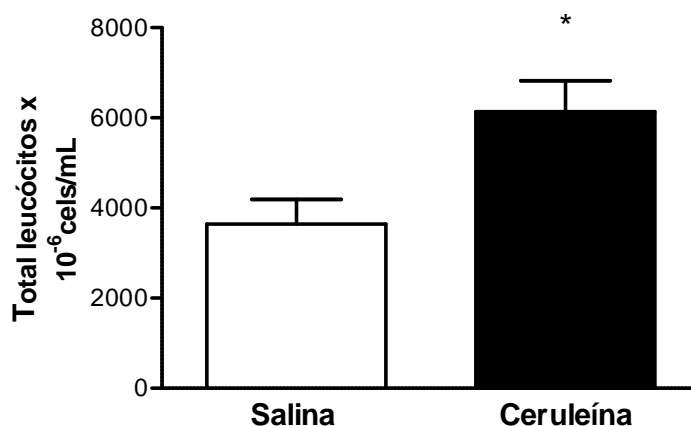


Figura 10 - Contagem total de células no LBA. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram traqueostomizados e lavagem dos pulmões foi realizada com PBS para avaliação do infiltrado celular. Houve um aumento de 1,68 vezes na quantidade de células dos animais com PA, quando comparados aos animais salina. *p<0,05 Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.7 Análise das citocinas plasmáticas

Através do sistema multiplex, tivemos a possibilidade de analisar vários biomarcadores em um mesmo poço em uma placa de 96 poços. Doze citocinas/quimiocinas se encontraram elevadas nos animais com PA induzida por ceruleína, quando comparados aos animais do grupo controle. Algumas citocinas como EPO, GRO-KC e IL-18 aumentaram em torno de 2x os valores nos animais com PA quando comparados aos do grupo controle. IL-10, uma citocina anti-inflamatória, também se mostrou significativamente elevada. (Tabela 3).

Tabela 3 - Níveis plasmáticos das citocinas

CITOCINA	SALINA	CERULEÍNA
EPO	50.82 ± 10.92	103.5 ± 16.75*
GRO-KC	24.92 ± 4.07	48.70 ± 10.62*
IL-1β	3.98 ± 1.20	6.69 ± 0.77*
IL-2	68.88 ± 4.87	88.85 ± 1.86*
IL-6	11.61 ± 2.18	17.44 ± 3.55
IL-10	26.16 ± 3.74	39.94 ± 3.64*
IL-12	3.79 ± 0.69	5.80 ± 0.43*
IL-17	2.77 ± 0.49	4.93 ± 0.88
IL-18	373.2 ± 59.03	674.7 ± 114.8*
TNF-α	5.52 ± 2.88	7.29 ± 1.20*
MIP-1	114.1 ± 34.39	285.9 ± 51.88*
VEGF	4.40 ± 0.62	6.86 ± 1.09

Os valores representam a média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. $p < 0,05$ Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.8 Análise histopatológica pancreática e pulmonar

Para análise histopatológica do pâncreas, os escores avaliados foram: edema, infiltração de PMN e necrose de células acinares. O exame histológico do pâncreas do grupo salina, mostrou arquitetura normal e ausência de lesões. Já a análise do grupo tratado com ceruleína revelou dano tecidual, caracterizado por necrose de células acinares, infiltrado de células inflamatórias e edema (figura 11). Os dados foram expressos como contagem total dos escores com uma mediana de 5 (2.75- 6.25) para o grupo salina e de 7 (5.75-9) para o grupo ceruleína.

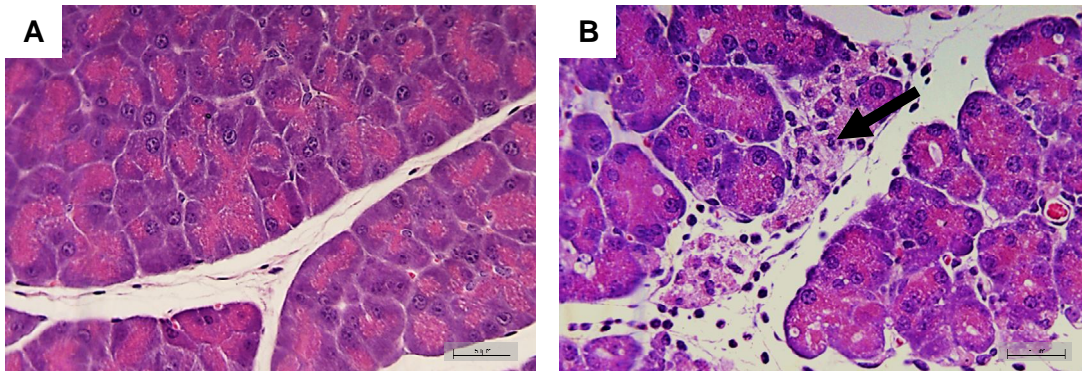


Figura 11- Análise histopatológica pancreática. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20 μ g/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram sacrificados, o pâncreas foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (400x). (A)-Fotomicrografia do pâncreas do grupo controle; (B)-Fotomicrografia do pâncreas dos animais com PA, mostrando dano extensivo do tecido pancreático e seta mostrando necrose de células acinares.

Os escores indicativos de lesão pulmonar avaliados foram: edema alveolar, infiltrado de PMN e espessamento alveolar. O exame histológico dos pulmões do grupo salina apresentaram arquitetura normal e ausência de lesões. Nos animais do grupo ceruleína foram encontrados edema, espessamento alveolar e infiltrado de PMN (figura 12). Os escores histológicos estão representados individualmente na tabela 4. Análise morfométrica também foi realizada para quantificação de alvéolos colapsados e normais, não havendo diferença entre os grupos em relação a esses parâmetros (tabela 5).

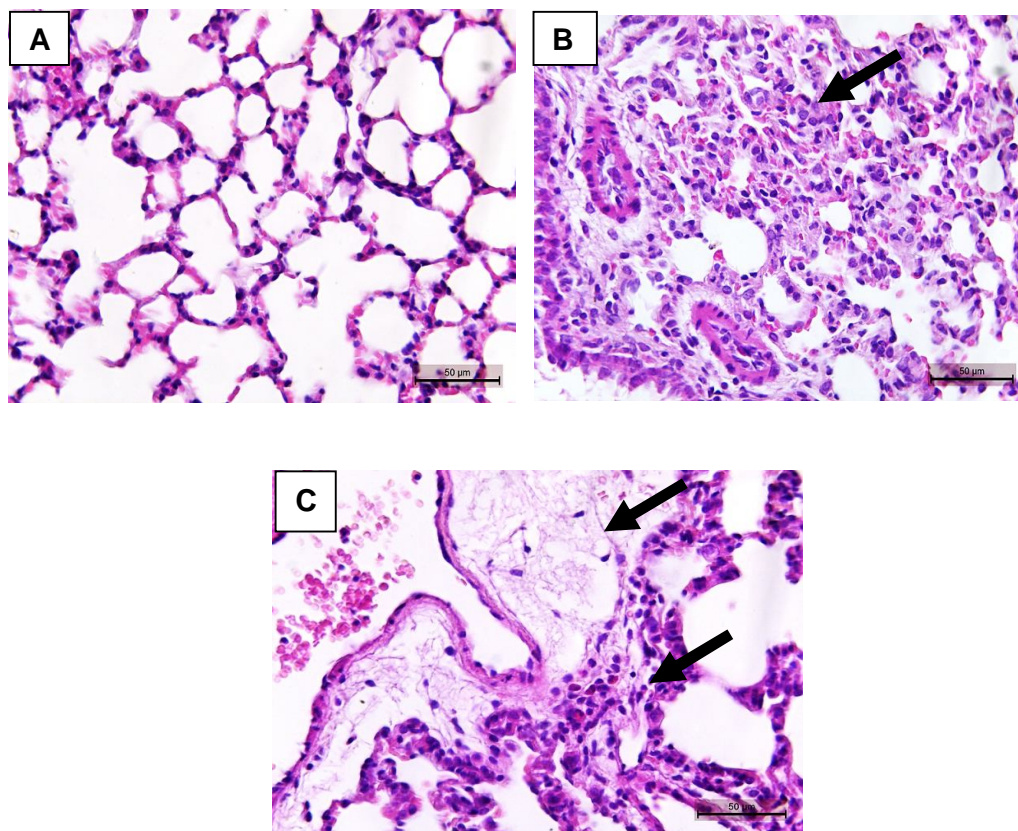


Figura 12- Análise histopatológica pulmonar. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram sacrificados, o pulmão foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E(400x). (A) – Fotomicrografia do pulmão do grupo controle; (B)- Fotomicrografia do pulmão dos animais com PA, seta mostrando espessamento alveolar; (C)- Fotomicrografia do pulmão dos animais com PA, seta superior mostrando edema e seta inferior mostrando infiltrado de células inflamatórias.

Tabela 4- Escores histopatológicos pulmonares na PA.

Grupo	Edema Alveolar	Infiltrado Inflamatório	Espessamento Alveolar	Escores totais
Salina	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (2-3)	5 (5-8.5)
Ceruleína	3 (2.25-3)*	3 (2.5-3)*	3 (2.25-3)*	9 (7.5-9)*

Tabela 4 - Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente, dos valores de 6 animais por grupo. *p< 0,05 Salina x Ceruleína. T teste não paramétrico seguido de Mann-Whitney.

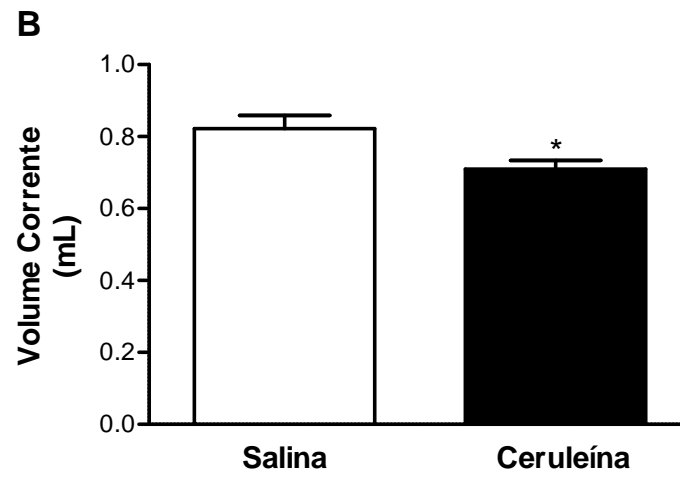
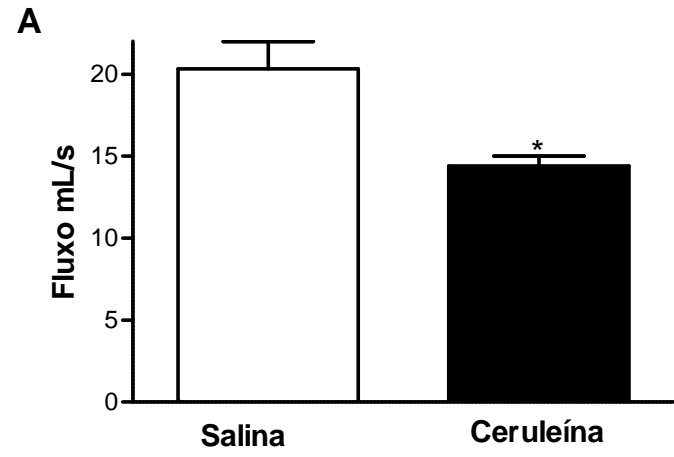
Tabela 5 - Análise morfométrica

Grupo	Alvéolos Colapsados	Alvéolos Normais
Salina	25.11 ± 1.41	74,75 ± 1.49
Ceruleína	25.38 ± 1.76	74,73 ± 1.76

Tabela 5 - Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente, dos valores de 6 animais por grupo. T teste não pareado.

4.9 Avaliação da função pulmonar

A espirometria foi realizada 24 horas após a primeira administração de ceruleína, havendo alterações significativas no fluxo dos animais com PA (14.40 ± 0.60) quando comparados aos do grupo controle (20.32 ± 1.68). Também houve alterações no VC dos animais tratados com ceruleína (0.70 ± 0.02) quando comparados aos animais controle (0.82 ± 0.03) e no VM dos animais ceruleína (87.01 ± 3.91) quando comparados aos animais salina (111.3 ± 5.69) (figura 13). A FR também foi avaliada, contudo não houve diferença entre grupo ceruleína (121.5 ± 2.76) e o grupo salina (127.2 ± 6.76). Os dados relacionados á espirometria realizada as 6, 12, 18 e 48 horas estão expressos como APÊNDICE, no final do trabalho.



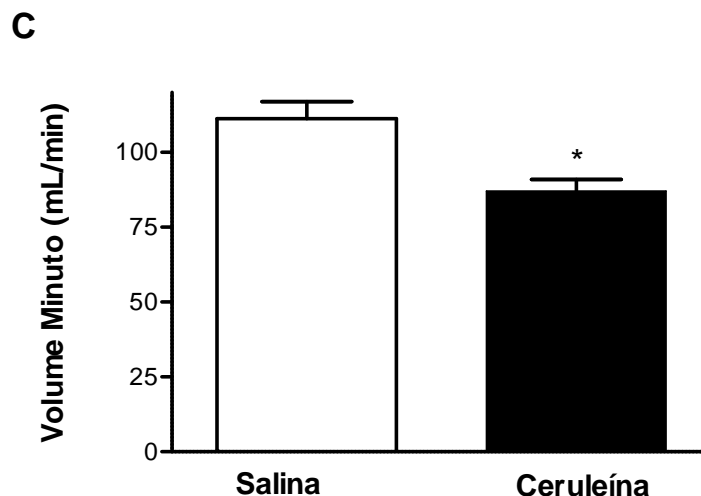


Figura 13 - Efeito da ceruleína sobre a função pulmonar. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram submetidos à espirometria para análise da função pulmonar. Houve redução do fluxo (A), no VC (B) e no VM (C) dos animais com PA, quando comparados aos animais controle. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo.* $p < 0,05$ Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.10 Avaliação da mecânica pulmonar

Os valores de Pressão de Pico se mostraram mais altos no grupo ceruleína (12.71 ± 0.42) quando comparados ao grupo salina (11.10 ± 0.41); valores de Edin também se mostraram significativamente diferentes nos animais com PA (8.62 ± 0.53) quando comparados com os animais salina (6.73 ± 0.53). Res e Cdin também foram avaliados, contudo não houve diferenças significativas na Res dos animais com PA (114.2 ± 8.45) quando comparados com o grupo controle (123.8 ± 8.45). A Cdin se mostrou menor nos animais com PA (116.3 ± 5.88), contudo também não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada aos animais controle (130.6 ± 8.97) (Figura 14).

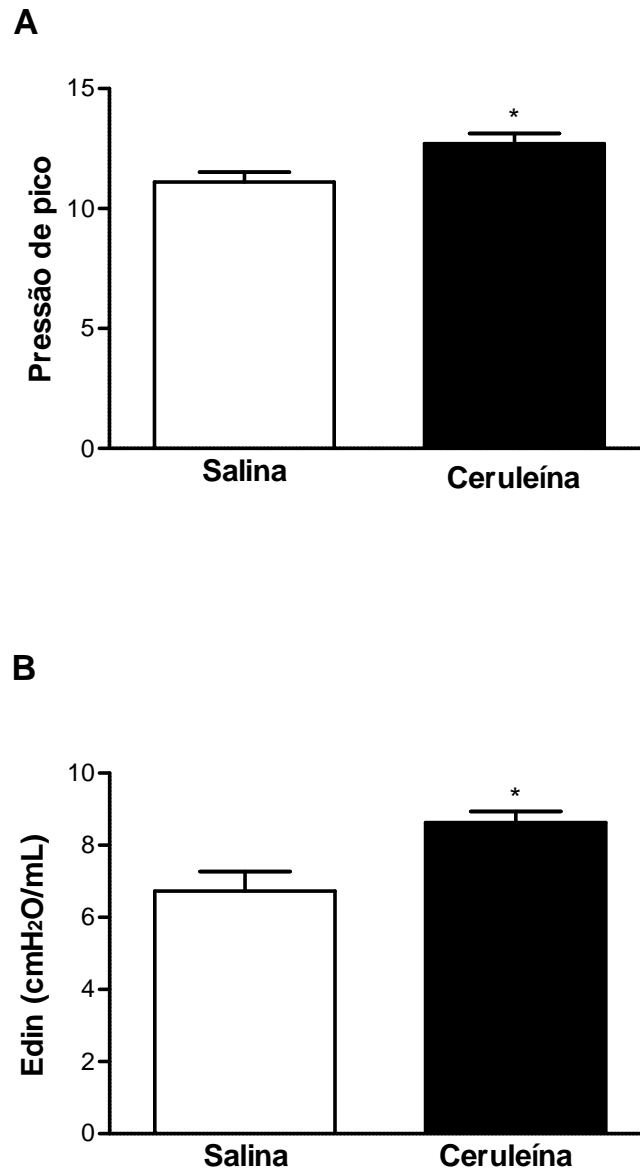


Figura 14 - Mecânica pulmonar. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, os animais foram submetidos à ventilação mecânica para análise da mecânica pulmonar. Pressão de Pico (A) e Edin (B) se mostraram significativamente maiores no grupo com PA, quando comparados ao grupo controle. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ Salina x Ceruleína. T teste não pareado.

4.11 Bacteremia

A figura 15 mostra a análise bacteriológica dos grupos salina e ceruleína. A figura A mostra tubo de ensaio com caldo BHI puro; a figura B

mostra o controle positivo, onde foi adicionado cepas de *Escherichia coli*; a figura C representa, da esquerda para a direita, amostra do controle positivo, amostra do grupo salina e amostra do grupo ceruleína, denotando que não foi encontrado crescimento bacteriano no sangue dos animais com PA e nos animais controle, pois o caldo BHI permaneceu translúcido.

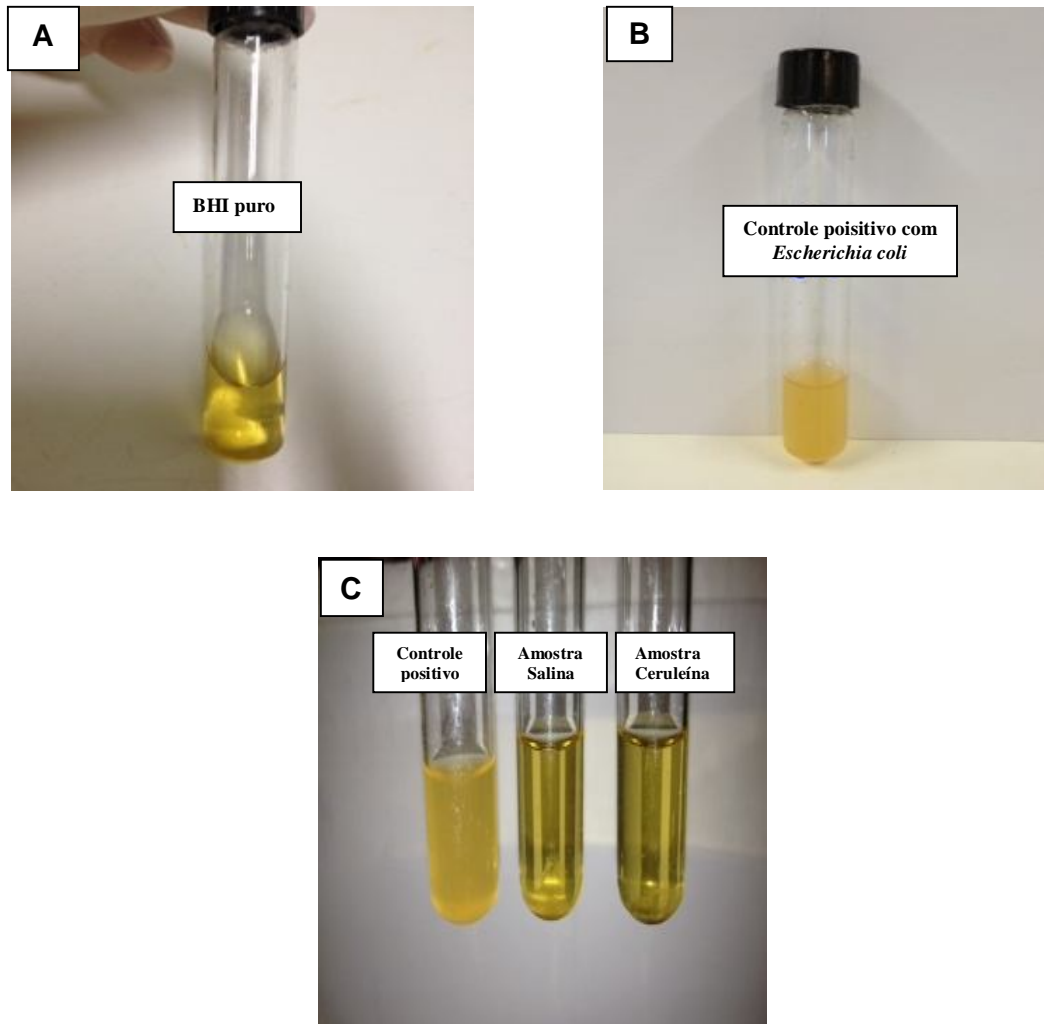


Figura 15 - Bacteremia. Cada animal foi submetido à administração de quatro doses de 20µg/kg de ceruleína separadas por intervalos de uma hora. 24 horas após a primeira administração de ceruleína, amostras de sangue foram coletadas e colocadas em caldo BHI para avaliação do crescimento bacteriano. 48 horas após a incubação, as amostras foram analisadas por um microbiologista. (A) - caldo BHI puro; (B) - controle positivo com *Escherichia coli*; (C) - Da esquerda para a direita: amostra do controle positivo, amostra do grupo salina e amostra do grupo ceruleína, mostrando que não houve crescimento bacteriano entre os grupos, pois o caldo continuou translúcido, ao contrário do controle positivo que ficou turvo.

5. Discussão

A lesão pulmonar é uma complicação grave da pancreatite aguda (PA) que aumenta a taxa de mortalidade da doença. Um terço das mortes relacionadas com PA acontecem antes da admissão hospitalar, e a maior parte dos casos estão relacionados com Lesão pulmonar aguda (LPA) e Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (MOREL et al., 2006; ZHOU et al., 2010). No presente estudo, mostramos que a PA induzida por ceruleína resultou em alterações inflamatórias e funcionais no pulmão. Durante a espirometria, a maior parte dos parâmetros apresentaram diferenças significativas entre os grupos com PA e o grupo controle. Na avaliação da mecânica pulmonar, os resultados também mostraram que houve uma mudança na função pulmonar no decorrer da PA induzida por ceruleína. Estes resultados relacionam-se com alterações inflamatórias encontradas no pulmão.

Na literatura, existem vários modelos de PA induzida por ceruleína, com diferentes doses e tempos de administração (ABDULLA et al., 2011; SHUGRUE et al., 2012). Alguns estudos relatam que a dose e o número de injeções de ceruleína determinam a gravidade da PA obtida (CHAN, LEUNG, 2007). Em virtude da não padronização desse aspecto, decidimos avaliar a função pulmonar, através da espirometria, em animais com PA induzida por diferentes doses de ceruleína. Em todos os tempos e doses analisadas, os animais apresentaram uma diminuição do fluxo pulmonar em torno de 20%, demonstrando que, para o nosso modelo de PA, a maior dose de ceruleína utilizada (nove administrações de 50µg/kg) culminou em diminuição da função pulmonar compatível com a menor dose (quatro administrações de 20µg/kg). Isso sugere que a alteração funcional pulmonar induzida por ceruleína não é dose-dependente.

Em virtude da observação de picos de amilase às 6, 12 e 24 horas e de lipase às 12 e 24 horas após a primeira administração de ceruleína, decidimos analisar o melhor período para avaliação da função pulmonar, utilizando o fluxo como parâmetro, pois todas as outras variáveis derivam dele. Observamos diminuição do fluxo também às 24 horas e, reforçados pela literatura que indica haver lesão tanto no pâncreas quanto no pulmão nesse intervalo (ELDER et al.,

2011; MELO et al., 2011), optamos por fazer todos os outros experimentos nesse período.

A atividade de amilase e lipase, assim como os parâmetros de função pulmonar, foram compatíveis com lesão pancreática e pulmonar, a partir de 6 horas após a primeira administração de ceruleína, com incremento nas 18 horas seguintes e decréscimo a partir de então; amilase voltou aos valores de normalidade após 48 horas da primeira administração. Estes dados sugerem que a lesão pulmonar decorrente da PA induzida por ceruleína é auto-limitada no tempo. Apenas a lipase permaneceu alta até 48 horas, um dado esperado, já que o nível sérico desta enzima apresenta alta sensibilidade e especificidade para PA e mantém-se elevado por vários dias (GUIMARÃES, 2009).

A gasometria arterial é utilizada para avaliar a capacidade do pulmão em realizar trocas gasosas. As alterações da PaO₂ e da PaCO₂ refletem o grau de participação da ventilação alveolar e das trocas alvéolo-capilares, e permite avaliar o grau de hipoxemia arterial relacionando-o ao grau de hipoventilação alveolar. É um exame invasivo que mede a concentração de oxigênio, a ventilação e o estado ácido-básico. Tipicamente, os valores gasométrico são obtidos quando o quadro clínico do paciente sugere alterações em uma dessas três variáveis (ROCHA et al., 2007). Contudo, existem muitas controvérsias na realização desse exame em animais, tendo em vista a sensibilidade dos gasômetros, pois não existe parêmetro específico para medir gases arteriais de animais. Várias pesquisas que avaliaram gasometria em ratos apresentam valores bastante diferentes uns dos outros e distintos dos valores que são considerados normalidade em humanos (MATSUDA et al., 2006; BRITO et al., 2008). Em nosso estudo encontramos parâmetros muitos similares aos de normalidade em humanos.

Os valores dos gases no sangue após tratamento com ceruleína não foram muito diferentes dos valores de controle. Matsuda et al., 2006, que avaliaram o papel dos macrófagos na lesão pulmonar decorrente de PA induzida por ceruleína, também demonstraram que não havia qualquer diferença nos gases sanguíneos entre o grupo controle e o grupo que recebeu ceruleína. No entanto, os animais que receberam ceruleína e injeção intravenosa de LPS, apresentaram uma condição de hipoxemia grave,

sugerindo que um maior insulto sistêmico é necessário para que haja mudanças nos parâmetros gasométricos.

Consistente com outros estudos, nossa pesquisa foi capaz de reproduzir PA induzida por ceruleína, indicada pelo aumento dos níveis séricos de amilase e lipase, um achado comum em estudos clínicos e experimentais (AHN et al., 2013; MALMSTRØM et al., 2012). Observamos também que houve aumento na atividade de MPO no pâncreas e pulmão e que houve uma ampla lesão pancreática e pulmonar, de acordo com a avaliação histológica. Embora vários estudos relatem as alterações inflamatórias do pulmão decorrentes da PA (GULTEKIN et al., 2007; MATSUDA et al., 2006), poucas pesquisas têm como foco a funcionalidade do pulmão no curso desse processo inflamatório.

Observamos em nosso estudo um aumento estatisticamente significativo na contagem total de células do LBA dos animais com PA, quando comparados com os animais controle de 1,68 vezes. Na pesquisa de Matsuda et al., 2006, a quantificação de células inflamatórias detectadas no LBA mostraram aumentos de 2,9 e de 6,7 nos animais com PA induzida por ceruleína e nos animais com PA e que receberam administração intravenosa de LPS, respectivamente, quando comparados aos grupos controles (salina). Já no estudo de Elder et al., 2012, apenas a PA induzida por ceruleína não foi capaz de aumentar a quantidade total de células presentes no LBA, quando comparado ao grupo controle. Só ocorreu aumento dessas células após a instilação de LPS na traquéia dos animais, o que diferencia do nosso estudo.

A espirometria, também conhecida como prova de função pulmonar ou prova ventilatória, é um exame que permite medir o fluxo de ar que entra e sai dos pulmões. Por meio dela, pode-se verificar se existe obstrução ou restrição ao fluxo de ar. Na prática clínica, é utilizada na mensuração de incapacidade funcional pulmonar, em avaliações pré e pós-operatórias e no diagnóstico de doenças respiratórias relacionadas ao trabalho (PEREIRA, 2002).

Nosso estudo avaliou fluxo, volume corrente (VC) e volume minuto (VM) por intermédio da espirometria e verificou que houve diferença estatisticamente significativa nesses parâmetros entre os grupos, mostrando que há uma maior demanda ventilatória no grupo com PA, o que reflete deterioração da função pulmonar. Contudo, a frequência respiratória (FR) permaneceu inalterada em ambos grupos.

Já a mecânica pulmonar estuda as forças que movem os pulmões e a parede torácica, bem como as resistências que elas superam durante o ciclo respiratório. Mensura as alterações pulmonares através da medição de parâmetros relativos a elasticidade e rigidez do pulmão (ELDER et al., 2011). É de fundamental importância para otimizar as intervenções terapêuticas no paciente entubado e submetido à ventilação mecânica, já que permite ajustes nos parâmetros ventilatórios (FAUSTINO, 2007).

Em nosso estudo, ao avaliarmos a mecânica pulmonar, a elastância, uma medida que indica a capacidade de recuo pulmonar durante a expiração, mostrou-se aumentada, o que é compatível com um incremento na resistência elástica do pulmão a forças externas. Este achado revela que é necessário uma maior pressão inspiratória para expandir os pulmões. A pressão de pico, que é a pressão máxima nas vias aéreas durante uma insuflação, também foi maior no grupo com PA, reforçando a hipótese de que uma pressão mais elevada é necessária para vencer a resistência das vias aéreas durante a inspiração no animal com PA. Já a complacência, que é a capacidade de distensibilidade dos pulmões em uma inspiração, mostrou-se também diminuída, embora não de forma estatisticamente significativa. Contudo, este dado sugere que os animais com PA também encontram dificuldade para expandir os pulmões.

Alguns estudos têm demonstrado que na LPA decorrente da PA induzida por ceruleína existe uma diminuição da produção de surfactante. O surfactante é uma mistura lipoproteica, com propriedades tensoativas, que reduz a tensão superficial entre o líquido presente na cavidade alveolar e o ar, aumentando, assim, a complacência pulmonar e evitando atelectasias (BROWNE, PITCHUMONI, 2006). Portanto, em nosso modelo, a diminuição do surfactante pode ser importante causa da formação de atelectasia em regiões pulmonares dependentes.

Os pacientes que desenvolvem a forma grave de PA geralmente necessitam de cuidados intensivos e de suporte com ventilação mecânica em decorrência do desenvolvimento de LPA e SDRA. Embora com menor frequência do que naqueles com pancreatite necrosante, os pacientes com pancreatite edematosa intersticial, uma forma mais leve de PA, também podem desenvolver insuficiência respiratória (BROWNE, PITCHUMONI, 2006).

Estudos apontam que cerca de 60% dos pacientes com PA desenvolvem complicações pulmonares, as quais podem variar de uma leve hipoxemia até a SDRA (CHOOKLIN et al., 2009).

Uma das vantagens do nosso modelo é a possibilidade de avaliar a função ventilatória por intermédio da espirometria, exame no qual o animal, apesar de anestesiado, permanece em respiração espontânea. Esse método constitui uma vantagem quando comparado à avaliação da mecânica pulmonar, já que nesta o animal deve estar sedado, analgesiado e curarizado para obtenção de valores fidedignos. Quanto à fidedignidade dos parâmetros mensurados na espirometria, esta foi obtida pelo uso de espirômetro projetado para utilização em animais de pequeno porte.

Elder et al., 2011, também desenvolveram um modelo PA induzida por ceruleína, encontrando achados inflamatórios como níveis de amilase aumentados, atividade de mieloperoxidase (MPO) e edema pancreático com um pico entre 12 e 24 horas após a indução. Decorridas 48 horas, os achados indicativos de PA começaram a diminuir, de acordo com a resolução da doença, o que corrobora o nosso estudo. No pulmão, a atividade de MPO mostrou-se aumentada, foram obtidos escores histológicos compatíveis com edema deste órgão e verificou-se aumento na contagem total de células no lavado bronco-alveolar (LBA). Contudo, apesar das indicações de inflamação pulmonar, não houve alterações significativas nos parâmetros de gasometria arterial bem como foram observadas mudanças modestas relacionadas à mecânica respiratória. De acordo com os autores, este dado indica que não houve danos graves à barreira epitelial alveolar.

O interesse em compreender melhor a relação entre a função pulmonar e o envolvimento inflamatório em modelos experimentais de PA provém da observação de que a disfunção das vias aéreas em seres humanos parece estar relacionada com a gravidade da doença. Elder et al., 2012, relataram em seu estudo que apenas a PA induzida por ceruleína seria incapaz de causar qualquer alteração na mecânica pulmonar e que seria necessário um grave comprometimento sistêmico, como sepse induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) no interior da traquéia, para que ocorresse algum tipo de alteração funcional do pulmão.

Os nossos dados contradizem, em parte, o trabalho de Elder et al., 2012. Há outros estudos que dizem ser necessário um grave insulto para que haja alteração na função pulmonar. Nestes foram avaliados os efeitos de isquemia / reperfusão do pâncreas, induzindo grave inflamação desta glândula, com edema e pancreatite hemorrágica necrosante, diminuição da capacidade residual funcional e da complacência pulmonar e aumento do trabalho respiratório (CHEN et al., 2008). Portanto, realizamos o estudo da bacteremia em nosso modelo, para avaliar se as alterações pulmonares eram decorrentes apenas da PA ou se havia a interferência de algum processo infeccioso sistêmico. A pesquisa bacteriológica, contudo, foi negativa para os grupos salina e ceruleína, reforçando a hipótese de que a PA induzida por ceruleína, isoladamente, é capaz de produzir alterações ventilatórias pulmonares.

PA induzida por ceruleína, também parece causar uma diminuição da força e da resistência do músculo diafragma. Como a lesão primária é encontrada no nível do interstício alveolar, é provável que esta reduza a complacência pulmonar e aumente o trabalho respiratório, levando a fadiga do diafragma mais rapidamente (BROWNE, PITCHUMONI, 2006).

Muitos estudos tentam mimetizar o que acontece na clínica com um paciente com PA grave que desenvolve LPA e SDRA, os quais geralmente são internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e submetidos a ventilação mecânica, o que favorece ao risco de infecções e piora do quadro clínico (GRAY et al., 2003; ELDER et al., 2012). Embora esteja claro que um insulto sistêmico maior, como sepse, leve a alterações mais relevantes da mecânica pulmonar, nosso estudo tem demonstrado que mesmo uma PA mais leve, induzida por ceruleína, é capaz de causar alterações, ainda que modestas, algumas significativas, da função pulmonar.

O envolvimento das citocinas na fisiopatologia PA tornou-se um tema constante no campo da pesquisa experimental. Existem evidências crescentes de que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, estejam envolvidas em complicações sistêmicas da PA, entre as quais se incluem insuficiência cardíaca e respiratória bem como falência renal e hepática (MUHS et al., 2003; CHOOKLIN et al., 2009). Diversos inibidores desses mediadores inflamatórios, como os antagonistas de IL-1 β e inibidores farmacológicos de TNF- α , têm sido sugeridos como um meio de minimizar a cascata inflamatória

local e sistêmica, podendo prevenir lesões de outros órgãos no decorrer da PA (UCAN et al., 2009).

Em nosso estudo tivemos oportunidade de, através de um sistema Multiplex, mensurar os níveis plasmáticos de doze citocinas que podem ter alguma influência na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) desencadeada pela PA, quais sejam: EPO, TNF- α , GRO-KC, MIP-1, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18.

No decurso da PA, TNF- α e IL-1 β são produzidas no pâncreas e ajudam a propagar o processo inflamatório, inicialmente local, para outros sítios do organismo. Essas citocinas agem como indutores primários de IL-6 e IL-8 e são conhecidas por causar febre, hipoperfusão, choque circulatório e SDRA (ZHNAG et al., 2007). Ao atingirem a circulação sistêmica, interagem com o endotélio vascular de órgãos distantes (principalmente o pulmão), contribuindo para a resposta inflamatória sistêmica que ocorre na PA grave (PATERNITI et al., 2012). Diaz et al., 1993, mostrou, *in vitro*, que altas concentrações de TNF- α provocam disfunção na contratilidade do diafragma, o que pode prejudicar a mecânica pulmonar, já que este é o principal músculo responsável pela respiração. Além disso, a inibição farmacológica e a expressão genética atenuada de TNF- α reduz a gravidade da lesão pulmonar em modelos experimentais de PA induzida por dieta ou por ceruleína (DENHAM et al., 1997; MALLEO et al., 2007; MALLEO et al., 2008).

Há registro na literatura de que o bloqueio da cascata de citocinas em nível de IL-1 β pelo uso do seu antagonista natural e específico IL-1ra diminui o processo inflamatório da PA induzida por ceruleína em ratos. Fato semelhante foi observado em camundongos ao empregarem-se animais nocaute para IL-1 β (NORMAN et al., 1995; DENHAM et al., 1997). Zhang et al., 2007, mostraram que inibidores de caspase-1, enzima responsável pela clivagem proteolítica dos precursores de IL-1 β e IL-18, transformando-os na forma ativa, foi capaz de diminuir a LPA na PA experimental.

Níveis de altos de IL-6 estão relacionados com a gravidade da PA e da SDRA, independentemente da etiologia (BATHIA, MOOCHHALA, 2004). Para avaliar, geneticamente, a função da IL-6 na LPA decorrente da pancreatite, Zhang et al., 2013, induziram PA por ceruleína em camundongos nocaute para IL-6 e observaram que houve um menor percentual de mortalidade neste grupo

quando comparado a animais selvagens nos quais se aplicou o mesmo modelo. Por outro lado, observou-se aumento significativo na taxa de mortalidade em animais que receberam injeção intravenosa de IL-6 antes da administração de ceruleína, quando comparados ao grupo que recebeu apenas solução salina, no qual não houve qualquer efeito sobre a sobrevivência. Os pesquisadores observaram, ainda, que a supressão genética de IL-6 diminuiu a LPA decorrente da pancreatite, fato evidenciado pela análise histológica, na qual se observou redução do espessamento alveolar e do acúmulo de células inflamatórias. Esses dados genéticos e farmacológicos sugerem que a IL-6 não é apenas um marcador, mas também um relevante mediador fisiopatológico da LPA no curso da PA, tendo repercussão, inclusive, na letalidade.

Um dos mais importantes fatores quimiotáticos endógenos para neutrófilos, a quimiocina GRO-KC (CXCL1), é expresso por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. Está envolvido na fisiopatologia da LPA e da SDRA, nas quais há infiltração maciça de neutrófilos no pulmão (BAO et al., 2010). Nossos resultados estão em consonância com esse relato, já que detectamos níveis elevados desta quimiocina no plasma assim como grande quantidade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar dos animais com PA, quando comparados com os animais do grupo controle.

No estudo clínico de Chooklin et al., 2009, pacientes admitidos em hospitais com PA apresentaram altos níveis de IL-1, IL-6, TNF- α e IL-18. Entretanto, concentrações mais altas de IL-18 foram encontradas em pacientes que evoluíram com insuficiência respiratória. Ainda de acordo com o autor, uma das principais funções desta interleucina é a estimulação de células Th1 na síntese de outras citocinas, em particular IL-1 β , IL-8 e TNF- α . Corroborando este dado, Akbarshahi et al., 2012, afirma que pacientes com PA nos quais os níveis de IL-18 são superiores a 650 pg/ml estão mais propensos a desenvolverem disfunção pulmonar.

VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular), também conhecido como fator de permeabilidade vascular, é uma glicoproteína, importante mediador inflamatório, pois estimula a angiogênese, tanto normal quanto patológica. Este mediador inflamatório é encontrado em níveis elevados em pacientes com PA e está relacionado com a disfunção de órgãos à distância nesta doença (UEDA et al., 2006). Em níveis elevados, promove aumento da

permeabilidade microvascular, edema pulmonar e prejuízo às trocas gasosas, porém foi provado seu papel como fator de sobrevivência de células epiteliais e endoteliais de modo que uma inibição significativa de sua expressão pode prejudicar a recuperação após uma lesão pulmonar. O aumento da expressão de VEGF está associado a derrame vascular e edema em vários modelos experimentais de lesão pulmonar (BATHIA, 2004). como na LPIV (Lesão Pulmonar Induzida por Ventilador). Hageman et al., 2013, desenvolveram um modelo experimental de LPIV e mostraram que o tratamento com dexametasona inibiu a expressão de VEGF nos pulmões dos animais ventilados mecanicamente. No entanto a dexametasona não protegeu a disfunção da barreira alvéolo-capilar neste modelo. Esses dados sugerem que existem outros mediadores envolvidos no mecanismo de aumento da permeabilidade alveolo-capilar ou que a inibição intensa da expressão de VEGF, que também desempenha um papel na estrutura e manutenção do tecido pulmonar, prejudicou o processo de reparação tecidual.

A IL-10 é uma das poucas citocinas anti-inflamatórias humanas. Ela impede a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , em particular nos macrófagos alveolares, sugerindo que pode diminuir a probabilidade do desenvolvimento de SDRA. Essa citocina também inibe a liberação de IL-6 e IL-1 β . A administração de IL-10 antes da indução da PA diminui a gravidade desta doença, o que levanta a possibilidade de seu uso no tratamento clínico da PA. (BROWNE, PITCHUMONI, 2006). Em nosso estudo, detectaram-se níveis elevados de IL-10. De acordo com Chooklin et al., 2009, no início de uma SRIS, o organismo produz, de forma compensatória, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, sendo a gravidade da doença dependente do equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias. No entanto, a produção prolongada de mediadores anti-inflamatórios poderia causar imunossupressão e agravar a doença.

Outro mediador inflamatório encontrado em níveis elevados em nosso estudo foi a eritropoietina (EPO). EPO é um membro da superfamília de citocinas tipo I, um hormônio produzido pelos rins e, em menor quantidade, pelo fígado. Sua principal função é regular a eritropoiese (produção de eritrócitos pela medula óssea). No entanto, foram identificados muitos outros papéis fisiológicos para EPO, entre os quais se incluem manutenção e

proteção tecidual, inibição de apoptose e de necrose, proteção contra hipóxia e atenuação de resposta inflamatória (UCAN et al., 2009).

O estresse oxidativo tem sido apontado como um importante ponto de referência na SDRA, pois aumenta a permeabilidade endotelial, fato que propicia afluxo de líquido para interior dos alvéolos e causa edema. Tascilar et al., 2007, avaliaram os efeitos da administração de EPO em animais com LPA decorrente de PA. Para isso, mensuraram os níveis de malonaldeído (MDA), considerado um bom indicador de peroxidação lipídica, os quais se encontraram diminuídos no grupo tratado com EPO quando comparado ao grupo controle; em nosso estudo, encontramos altos níveis de MDA sérico, que denota haver aumento de radicais livres e estresse oxidativo em nosso modelo. Esses autores afirmam que é necessária uma elevada concentração de EPO - em torno de 300-500 mUI/kg - para que ocorra proteção contra lesão tecidual. Entretanto, nesses estudos não foi dosada a quantidade de EPO endógeno; portanto, nossa hipótese é que, assim como a IL-10 tem seus níveis elevados de forma compensatória na SRIS, também ocorre aumento dos níveis de EPO nessa situação como uma tentativa do organismo de proteger os tecidos. Corroborando nossa hipótese, Nairz et al., 2012, afirma que uma redução de hemoglobina, ou dos níveis de oxigenação, ou um maior consumo de oxigênio nos tecidos periféricos pode induzir a produção de EPO.

Algumas citocinas que se mostraram elevadas em nosso estudo, quando comparados os animais com PA e os do grupo controle, têm sua função estabelecida como mediadores inflamatórios. Contudo, há escassez de referências bibliográficas quanto ao envolvimento das mesmas na fisiopatologia da PA e da LPA.

Nesse sentido, tem-se descrito a IL-17 como um potente mediador inflamatório, relacionado com diversas doenças como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla e asma. Pela sua capacidade de sinergismo com outras citocinas pró-inflamatórias, a IL-17 induz o recrutamento de neutrófilos e a produção de IL-8. Adicionalmente, ela estimula a produção de IL-6, a qual agrava o processo inflamatório (FRANGEN et al., 2008). Quanto à MIP-1, esta é uma quimiocina produzida por macrófagos, principalmente após serem estimulados por endotoxinas bacterianas; é crucial para respostas imunes no contexto de processos infecciosos e inflamatórios. Assim como a IL-

17, ela induz a síntese e liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, entre as quais IL-1, IL-6 e TNF- α , a partir de fibroblastos e macrófagos (REN et al., 2010). Já a IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que induz a resposta de células Th1. Níveis elevados deste mediador em pacientes com PA estão relacionados com a gravidade da doença (SANNELLO et al., 2008).

Nosso estudo demonstrou que PA induzida por ceruleína é capaz de causar alterações inflamatórias e funcionais no pulmão, a despeito de outros estudos que utilizaram este modelo não terem obtido achados semelhantes. A alteração na função pulmonar foi semelhante nas várias doses de ceruleína analisadas, sugerindo que a disfunção pulmonar induzida por esta droga não é dose-dependente. Embora esteja claro que um insulto sistêmico maior, como sepse, leve a alterações mais relevantes da mecânica pulmonar, nosso estudo tem demonstrado que mesmo uma PA mais leve, induzida por ceruleína, é capaz de causar disfunções respiratórias. Nossos dados sugerem que essas disfunções são decorrentes do processo inflamatório, no qual diversos mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, podem estar envolvidos.

6. Conclusão

- Ceruleína induz pancreatite aguda em ratos com elevação dos níveis de amilase e lipase pancreática;
- Pancreatite aguda causa alterações histopatológicas no pâncreas e no pulmão dependente do infiltrado neutrofílico, radicais livres e citocinas inflamatórias;
- Pancreatite aguda induz alterações espirométricas e na mecânica pulmonar;
- Disfunção pulmonar decorrente de pancreatite aguda induzida por ceruleína não envolve processo infeccioso.

REFERÊNCIAS

ABDULLA, A., AWLA, D., HARTMAN, H., RAHMAN, M., JEPPSSON, B., REGNÉR, S., THORLACIUS, H.; Role of platelets in experimental acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2011 Jan;98(1):93-103. doi: 10.1002/bjs.7271. **Epub** 2010 Sep 29.

AHN, D.W., RYU, J.K., KIM, J., KIM, Y.T., YOON, Y.B., LEE, K., HONG, J.T.; Inflexinol reduces severity of acute pancreatitis by inhibiting nuclear factor- κ B activation in cerulein-induced pancreatitis. **Pancreas.** 2013 Mar;42(2):279-84. doi: 10.1097/MPA.0b013e318264993c

AKBARSHAH, H., ROSENDAHL, A.H., WESTERGREN-THORSSON, G., ANDERSSON R.; Acute lung injury in acute pancreatitis e Awaiting the big leap. **Respir Med.** 2012 Sep;106(9):1199-210. doi: 10.1016/j.rmed.2012.06.003. **Epub** 2012 Jun 29.

BANKS P.A., BOLLEN T.L., DERVENIS C., GOOSZEN H.G., JOHNSON C.D., SARR M.G., TSIOTOS G.G., VEGE S.S.; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus *Gut.* 2013 Jan;62(1):102-11. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302779. **Epub** 2012 Oct 25.

Banks PA, Freeman ML; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol.** 2006;101:2379-2400.

BAO, Z., YE, Q., GONG, W., XIANG, Y., WAN, H.; Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury. **Int Immunopharmacol.** 2010 Feb;10(2):259-63. doi: 10.1016/j.intimp.2009.11.005. **Epub** 2009 Nov 10.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G.; Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60 (3), p. 618-622, 1982.

BRITO, M.V.H.; CUNHA, I.C.C.; MAYRA GONÇALVES ARAGÓN, M.G.; BRAGA, T.G.M.; LIMA, F.D.; Efeitos da estocagem sanguínea em gelo na bioquímica e gasometria arterial de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol. 23 (5) 2008 – 462.

BROWNE, G.W., PITCHUMONI, C.S.; Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.** 2006 Nov 28;12(44):7087-96

CAMPOS, T., et al.; Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. *Rev.Col. Bras.Cir.*, v.35, p.304-310, 2008).

CHAN, Y.C.; LEUNG, P.S.; Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. **Pancreas**.v. 34(1), p. 1-14, 2007.

CHEN, C.F., CHEN, H.T., WANG, D., LI, J.P., FONG, Y.; Restrictive ventilatory insufficiency and lung injury induced by ischemia/reperfusion of the pancreas in rats **Transplant Proc.**2008 Sep;40(7):2185-7.

CHOOKLIN, S.; Pathogenic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** 2009 Apr;8(2):186-92.

CRUZ-SANTAMARÍA, D.M., TAXONERA, C., GINER, M.; Update on pathogenesis and clinical management of acute pancreatitis. **World J Gastrointest Pathophysiol.** 2012 Jun 15;3(3):60-70.

DENHAM, W; YANG, J; FINK, G; DENHAM, D; CARTER, G; WARD, K; NORMAN, J. Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. **Gastroenterology**.v.113, p.1741-1746, 1997.

DE LA MANO, A.M., SEVILLANO, S., MANSO, M.A., PEREZ, M., DE DIOS, I.; Cholecystikinin blockade alters the systemic immune response in rats with acute pancreatitis. **Int J Exp Pathol**.v. 85, p. 75-84, 2004.

ELDER, A.S., SACCONI, G.T., BERSTEN, A.D., DIXON, D.L.; Caerulein-induced acute pancreatitis results in mild lung inflammation and altered respiratory mechanics. **Exp Lung Res.** 2011 Mar;37(2):69-77. doi: 10.3109/01902148.2010.516307. Epub 2010 Nov 15.

ELDER, A.S., SACCONI, G.T., BERSTEN, A.D., DIXON, D.L.; Evaluation of lung injury and respiratory mechanics in a rat model of acute pancreatitis complicated with endotoxin. **Pancreatology.** 2012 May-Jun;12(3):240-7. doi: 10.1016/j.pan.2012.03.001. Epub 2012 Mar 10.

FAUSTINO, E.A.; Mecânica pulmonar de pacientes em suporte ventilatório na UTI conceitos e monitorização. **Rev. Bras. de Terapia Intensiva.** vol. 19, nº. 02, São Paulo, abril/junho, 2007.

FRANCO, J.; FERNANDES, R.; OLIVEIRA, M.; ALVES, A.D.; BRAGA, M.; SOARES, I.; CALHAU, P. Acute pancreatitis associated with varicella infection in an immunocompetent child. **J Paediatr Child Health.** v. 21, 2009.

FRANGEN, T.M., BOGDANSKI, D., SCHINKEL, C., ROETMAN, B., KÄLICKE, T., MUHR, G., KÖLLER, M.; Systemic IL-17 after severe injuries. **Shock.** 2008 Apr;29(4):462-7.

GUIMARÃES, M.A.C.F., MAYA, A.C.A., LEAL, P.R.F., MELGAÇO, A.S.; Pancreatite aguda: etiologia, apresentação, clínica e tratamento. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UFRJ, ano 8, Janeiro/Junho de 2009.

GULTEKIN, F.A., KEREM, M., TATLICIOGLU, E., ARICIOGLU, A., UNSAL, C., BUKAN, N.; Leptin treatment ameliorates acute lung injury in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.** 2007 Jun 7;13(21):2932-8.

HAGIWARA, S., IWASAKA, H., SHINGU, C., MATSUMOTO, S., UCHIDA, T., NOGUCHI, T. Antithrombin III prevents cerulein-induced acute pancreatitis in rats. **Pancreas.** 2009 Oct;38(7):746-51. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181aba9fa.

LEE, J., HWAN, K. K., KIM, H. Role of vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) on IL-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. **Ann N Y Acad Sci.** 2007 Jan;1095:129-33.

LUNOVA, M., ZIZER, E., KUCUKOGLU, O., SCHWARZ, C., DILLMANN, W.H., WAGNER, M., STRNAD, P.; Hsp72 overexpression accelerates the recovery from cerulein-induced pancreatitis. **PLoS One.** 2012;7(7):e39972. doi: 10.1371/journal.pone.0039972. **Epub** 2012 Jul 5.

MACHADO, M.M., ROSA, A.C.F., NESTOR DE BARROS, N., CERRI, L.M.O., AZEREDO, L.M., CERRI, G.G. Pancreatite aguda leve: avaliação pela ultrasonografia. Estudo prospectivo. **Radiol Bras** 2002;35(4):213-216

MALLEO, G.; MAZZON, E.; GENOVESE, T.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; SIRIWARDENA, A.K.; CUZZOCREA, S. Effects of thalidomide in a mouse model of cerulein-induced acute pancreatitis. **Shock.** v. 29(1), p. 89-97, 2008.

MATSUDA, N., NISHIHARA, J., TAKAHASHI, Y., KEMMOTSU, O., HATTORI, Y.; Role of macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury in mice with acute pancreatitis complicated by endotoxemia. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2006 Aug;35(2):198-205. **Epub** 2006 Mar 30.

MELO, C.M., MORAIS, T.C., TOMÉ, A.R., BRITO, G.A., CHAVES, M.H., RAO, V.S., SANTOS F.A.; Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflamm Res.** 2011 Jul;60(7):673-81. doi: 10.1007/s00011-011-0321-x. **Epub** 2011 Mar 12.

MALMSTRØM, M.L., HANSEN, M.B., ANDERSEN, A.M., ERSBØLL, A.K., NIELSEN, O.H., JØRGENSEN, L.N., NOVOVIC, S.; Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis. **Pancreas.** 2012 Mar;41(2):271-7. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182240552.

MOREL, D.R., FROSSARD, J.L., CIKIRIKCIOGLU, B., TAPPONNIER, M., PASTOR, C.M.; Time course of lung injury in rat acute pancreatitis. **Intensive Care Med.** 2006 Nov;32(11):1872-80. **Epub** 2006 Jul 15.

MORETTI, A.I.S.; Efeito da solução hipertônica sobre a expressão de proteínas ativas por choque térmico (HSPs) e atividade de metaloproteinases (MMPs) na resposta inflamatória em pancreatite aguda experimental. 2007. 77f. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MUHS, B.E., PATEL, S., YEE, H., MARCUS, S., SHAMAMIAN, P. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces local and distant organ injury following experimental acute pancreatitis. **J Surg Res**. n.109, v.2, p. 110-7, 2003.

NAIRZ, M., SONNWEBER, T., SCHROLL, A., THEURL, I., WEISS, G.; The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. **Microbes Infect**. 2012 Mar;14(3):238-46. doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.005. Epub 2011 Nov 4.

NORMAN, J.G.; FINK, G.W.; FRANZ, M.G. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. **Arch Surg**, v. 130, p. 966-970, 1995.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**. v. 95, p. 351- 358, 1979.

OSMAN, M.O., KRISTENSEN, J.U., JACOBSEN, N.O., LAUSTEN, S.B., DELEURAN, B., DELEURAN, M., GESSER, B., MATSUSHIMA, K., LARSEN, C.G., JENSEN, S.L.; A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotizing pancreatitis in rabbits. **Gut**. 1998;43:232Y239.

PATERNITI, I.; MAZZON, E.; RICCARDI, L.; GALUPPO, M.; IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CAPPELLANI, A.; CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice. **Surgery**. v. 152(1), p. 90-106, 2012.

PASTOR, C.M.; MATTHAY, M.; FROSSARD, J.L. Pancreatitis-associated lung injury: new insights. *Chest*, v.124, p. 2341-51, 2003.

PEREIRA, C.A.S., Espirometria. **J Pneumol** 28(Supl 3) – outubro de 2002.

REN, M., GUO, Q., GUO, L., LENZ, M., QIAN, F., KOENEN, R.R., XU, H., SCHILLING, A.B., WEBER, C., YE, R.D., DINNER, A.R., TANG, W.J.; Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. **EMBO J**. 2010 Dec 1;29(23):3952-66. doi: 10.1038/emboj.2010.256. Epub 2010 Oct 19.

ROCHA, S.L.; SOUZA, G.R.M.R.; ABUJAMRA, K.B.; OSTROWSKI, M.A.B.; SOUZA, M.C.M.R.; Gasometria arterial e inflamação pulmonar de ratos com diferentes tempos de sepse abdominal. **ABCD Arq Bras Cir Dig** 2007;20(1):28-33.

SAH, R.P., GARG, P., SALUJA, A.K.; Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol**. 2012 Sep;28(5):507-15. doi: 10.1097/MOG.0b013e3283567f52.

SEVILLANO, S., DE LA MANO, A.M., MANSO, M.A., ORFAO, A., DE DIOS I.; N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic ductobstruction-induced acute pancreatitis. **Biochim Biophys Acta**.v.1639, p. 177-84, 2003.

SHUGRUE, C.A., ALEXANDRE, M., DE VILLALVILLA, A.D., KOLODECNIK, T.R., YOUNG, L.H., GORELICK, F.S., THROWER, E.C.;Cerulein hyperstimulation decreases AMP-activated protein kinase levels at the site of maximal zymogen activation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2012 Sep 15;303(6):G723-32. doi: 10.1152/ajpgi.00082.2012. Epub 2012 Jul 19.

TASCILAR, O., CAKMAK, G.K., TEKIN, I.O., EMRE, A.U., UCAN, B.H., BAHADIR, B., ACIKGOZ, S., IRKORUCU, O., KARAKAYA, K., BALBALOGLU, H., KERTIS, G., ANKARALI, H., COMERT, M.;Protective effects of erythropoietin against acute lung injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. **World J Gastroenterol**. 2007 Dec 14;13(46):6172-82

UCAN BH, IRKORUCU O, CAKMAK GK, TASCILAR O, TEKIN IO, ACIKGOZ S, EMRE AU, BAHADIR B, ANKARALI H, COMERT M. Erythropoietin: a possible cytoprotective cytokine in acute necrotizing pancreatitis. **J Hepatobiliary Pancrea tSurg**. 2009;16(4):530-7. doi: 10.1007/s00534-009-0082-x. Epub 2009 Mar 31.

ZAHEER, A., Singh, V.K., Qureshi, R.O., Fishman, E.K.;The revised Atlanta classification for acute pancreatitis: updates in imaging terminology and guidelines. **Abdom Imaging**. 2013 Feb;38(1):125-36.doi: 10.1007/s00261-012-9908-0.

ZHANG, X.H., ZHU, R.M., XU, W.A., WAN, H.J., LU, H.; Therapeutic effects of caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis.**World J Gastroenterol**. 2007 Jan 28;13(4):623-7.

ZHANG, X.P.; LI, Z.J.; ZHANG, J.; Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis.**HepatobiliaryPancreat Dis Int**. v. 8 (4), p. 351-357, 2009b.

ZHANG, H., NEUHÖFER, P., SONG, L., RABE, B., LESINA, M., KURKOWSKI, M.U., TREIBER, M., WARTMANN, T., REGNÉR, S., THORLACIUS, H., SAUR, D., WEIRICH, G., YOSHIMURA, A., HALANGK, W., MIZGERD, J.P., SCHMID, R.M., ROSE-JOHN, S., ALGÜL, H.;IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis associated lung injury and lethality.**J Clin Invest**. 2013 Mar 1;123(3):1019-31. doi: 10.1172/JCI64931. **Epub** 2013 Feb 15

ZHOU, M.T., CHEN, C.S., CHEN, B.C.,ZHANG, Q.Y., ANDERSSON, R.; Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. **World J Gastroenterol**. 2010 May 7;16(17):2094-9.

**APÊNDICE- AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR, ATRAVÉS DA
ESPIROMETRIA, AS 6, 12, 18 E 48 HORAS APÓS A INDUÇÃO DE PA.**

Tabela 6- Avaliação da função pulmonar 6 horas após indução da PA

PARÂMETRO	SALINA	CERULEÍNA
FLUXO	24.85 ± 2.77	24.82 ± 2.88
VC	1.67 ± 1.15	1.68 ± 0.16
FR	123.1 ± 4.33	115.1 ± 5.12
VM	20.41 ± 2.26	19.13 ± 1.75

Os valores representam a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo.

Tabela 7- Avaliação da função pulmonar 12 horas após indução da PA

PARÂMETRO	SALINA	CERULEÍNA
FLUXO	18.10 ± 1.34	19.09 ± 0.09
VC	1.39 ± 0.03	1.37 ± 0.04
FR	116.0 ± 4.83	115.0 ± 6.50
VM	15.99 ± 0.27	15.63 ± 0.58

Os valores representam a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo.

Tabela 8 - Avaliação da função pulmonar 18 horas após indução da

PARÂMETRO	SALINA	CERULEÍNA
FLUXO	17.98 ± 0.94	16.78 ± 0.52
VC	1.29 ± 0.03	1.17 ± 0.12
FR	121.6 ± 5.06	122.9 ± 3.30
VM	15.67 ± 0.36	15.8 ± 0.21

Os valores representam a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo.

Tabela 9- Avaliação da função pulmonar 48 horas após indução da PA

PARÂMETRO	SALINA	CERULEÍNA
FLUXO	19.53 ± 0.52	21.37 ± 1.04
VC	1.39 ± 0.03	1.35 ± 0.03
FR	110.8 ± 5.84	118.7 ± 7.87
VM	15.38 ± 0.59	15.93 ± 0.93

Os valores representam a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo.

