

BIANCA D'ELIA MATZKE

**AVALIAÇÃO DO USO DE BACTÉRIAS
PROBIÓTICAS NA PANCREATITE AGUDA
INDUZIDA EM RATOS**

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIRURGIA) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – como requisito final para a obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Setembro de 2008

BIANCA D'ELIA MATZKE

**AVALIAÇÃO DO USO DE BACTÉRIAS
PROBIÓTICAS NA PANCREATITE AGUDA
INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências

Cirúrgicas (PG-FISIOCIRURGIA)

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Rio de Janeiro, 03 de setembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade (Presidente)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Maria Cristina Araújo Maya
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/ BIBLIOTECA CB/A

M446	<p>Matzke, Bianca D'Elia. Avaliação do uso de bactérias probióticas na pancreatite aguda induzida em ratos / Bianca D'Elia Matzke. – 2008. xiv, 77f.</p> <p>Orientador : Ruy Garcia Marques. Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Pancreatite – Teses. 2. Suplementos dietéticos – Teses. 3. Alimentos funcionais – Teses. 4. Translocação bacteriana – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Marques, Ruy Garcia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.37-002</p>
------	--

A meu eterno e saudoso pai, Walter Matzke, a minha mãe, Maria Elisabete D'Elia Matzke, e a minha avó, Nakma de Oliveira Cruz D'Elia, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida.

Ao meu noivo, Ricardo do Carmo Bastos.

Ao meu irmão, Bruno D'Elia Matzke.

AGRADECIMENTOS

Ao final de mais uma etapa em minha vida, gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que se tornasse realidade.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ruy Garcia Marques, pelos ensinamentos, pela paciência, credibilidade e confiança depositados em mim. Gostaria que soubesse que o admiro e o considero um exemplo de pessoa e de profissional, que sempre estimulou e contribuiu para o aprimoramento e desenvolvimento da área acadêmica no Rio de Janeiro e no Brasil.

Ao médico-veterinário Carlos Eduardo Rodrigues Caetano e aos bioteristas Domingos Henrique de Souza Peçanha, Cláudio Sérgio Correa Lau e Alessandra Demétrio do Nascimento, do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pela ajuda na realização dos procedimentos cirúrgicos e pelo apoio e auxílio nas atividades desenvolvidas no laboratório.

Ao Professor Doutor Arnaldo Feitosa B. Andrade e ao biólogo Denílson Ferreira Batista, pela colaboração na realização das análises microbiológicas, assim como pela inestimável ajuda no esclarecimento de todas as dúvidas.

Ao Professor Doutor José Firmino Nogueira Neto, coordenador do Laboratório de Lípidos (LabLip) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), pela colaboração, presteza e realização da análise bioquímica.

Ao Professor Doutor Luiz Carlos de Aguiar Vaz, da Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pelo auxílio na realização da análise morfológica.

À Professora Doutora Margareth Crisóstomo Portela, pesquisadora do Departamento de Administração e Planejamento em Saúde da Escola Nacional de

Saúde Pública Sergio Arouca, ENSP – FIOCRUZ, pela colaboração na análise estatística dos resultados do experimento.

À Nutricionista Cristina Fajardo Diestel, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, que me incentivou na realização desta pós-graduação, pelo auxílio em várias etapas da realização desta pesquisa.

Às minhas amigas e nutricionistas Nara Limeira Horst, Fernanda Corrêa Simões, Ana Paula Gonçalves Dinis, Mônica Vieira Mano de Souza e Etiene de Aguiar Picanço, pelo constante incentivo, companheirismo e ajuda durante esta pós-graduação.

Às bolsistas de Iniciação Científica Camila Barbosa Alves e Ellen Almeida dos Santos, alunas do curso de Nutrição da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), pela constante ajuda na realização dos experimentos e nos cuidados aos animais.

Às residentes de Nutrição do Programa de Nutrição em Cirurgia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Rafaela Cabral Moreira, Beatriz Peixoto Ramos e Viviane Abrantes Jardim, pelo auxílio no cuidado com os animais.

À minha grande amiga e nutricionista Carla Alexandra Almeida Salmazo, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, que sempre esteve ao meu lado, incansavelmente, durante a realização desta pós-graduação.

À minha família, especialmente aos meus pais, Walter Matzke e Maria Elisabete D'Elia Matzke, ao meu irmão, Bruno D'Elia Matzke, e a minha avó, Nakma de Oliveira Cruz D'Elia, pelo convívio familiar, paciência, incentivo e por serem um dos principais alicerces na minha formação profissional e acadêmica.

Ao meu noivo, Ricardo do Carmo Bastos, pela paciência e compreensão pelas minhas constantes ausências.

Ao meu querido cunhado, Bruno do Carmo Bastos, pelo companheirismo e auxílio em algumas etapas desta pesquisa.

Aos meus futuros sogros, Sheila Maria do Carmo Bastos e Ricardo Moreira Bastos, e ao meu cunhado, Bernardo do Carmo Bastos, pela convivência familiar e pelas inestimáveis palavras amigas e incentivadoras.

Às demais pessoas que contribuíram de alguma maneira, para que este trabalho pudesse ser realizado.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	Xiii
1 – RESUMO	1
2 – ABSTRACT	3
3 – INTRODUÇÃO	5
4 – OBJETIVOS	12
5 – MÉTODO	13
5.1 Animais e grupos	14
5.2 Composição da ração	14
5.3 Suplementação dietética com bactérias probióticas	15
5.4 Controle de peso e de ingestão de ração e água	15
5.5 Indução da pancreatite aguda	16
5.6 Coleta das amostras sanguíneas	18
5.7 Análise laboratorial	19
5.8 Remoção das peças operatórias	19
5.9 Estudo Morfológico	20
5.10 Estudo Microbiológico	20
5.11 Análise Estatística	22
5.12 Aspectos éticos nos cuidados com os animais	23
6 – RESULTADOS	24
6.1 Evolução dos animais	24

6.2 Evolução do peso corporal e ingestão de água e ração	24
6.2.1 – Peso corporal	24
6.2.2 – Ingestão de água e de ração	25
6.3 Evolução dos resultados dos exames laboratoriais	26
6.4 Estudo Morfológico	31
6.5 Cultura de microrganismos	35
7 – DISCUSSÃO	41
8 – CONCLUSÃO	56
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO	69

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de média \pm desvio padrão das seguintes variáveis: consumo médio de ração e de água, peso corporal médio e peso corporal em D1 e D7, nos cinco grupos de animais.	25
Tabela 2. Valores médios dos resultados dos exames laboratoriais nos cinco grupos de animais.	28
Tabela 3. Percentual da ocorrência de alterações histopatológicas nos animais dos grupos submetidos a indução de pancreatite aguda (grupos 2, 3, 4 e 5), de acordo com o acometimento do segmento pancreático.	34
Tabela 4. Percentual da ocorrência de hemorragia pancreática nos grupos de animais sem suplementação – A (grupo 2) e com suplementação de bactérias probióticas – B (grupos 3, 4 e 5), de acordo com análise microscópica.	35
Tabela 5. Proporção de culturas positivas para microrganismos aeróbicos em relação ao número de animais, em cada grupo de estudo.	36
Tabela 6. Proporção de tecidos com culturas positivas para microrganismos aeróbicos, em relação ao número de animais, em cada grupo de estudo.	37
Tabela 7. Colonização bacteriana observada nos animais dos grupos II, III, IV e V.	39

Tabela 8. Percentual de contaminação dos órgãos por grupo de animais.	40
--	-----------

	Página
Figura 1. Indução de PA: inoculação do taurocolato de sódio a 5% no ducto biliopancreático de rato	17
Figura 2. Evolução do peso corporal médio dos animais, entre D1 e D7.	26
Figura 3. Evolução da contagem leucocitária média, por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.	27
Figura 4. Evolução dos níveis séricos médios de glicose, por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.	29
Figura 5. Evolução dos valores médios dos níveis séricos de amilase (A) e de lipase (B), por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.	30
Figura 6. Evolução do nível médio de cálcio sérico, por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.	30
Figura 7. Pancreatite Aguda: A e B – Presença de grande quantidade de líquido na cavidade peritoneal; C – aspecto morfológico do parênquima pancreático, com lesões em “pingos de vela”.	32
Fig. 8. Fotomicrografias de tecido pancreático dos animais: A – grupo 1 – tecido pancreático normal; B, C, D, E – grupos 2, 3, 4 e 5, respectivamente – extensas lesões acinares, com áreas de hemorragia. Em B e C, identificam-se áreas de hemorragia (setas).	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α – alfa

B – baço;

β – beta

BP – bactérias probióticas

° C – graus Celsius

cm – centímetro

D – dia

\pm – desvio padrão

dl – decilitro

F – fígado;

g – grama

GALT – tecido linfóide associado ao intestino

IgA – imunoglobulina A

IL – interleucina

l – litro

LabLip – Laboratório de Lípidos

LN – linfonodo ileal;

LP – líquido peritoneal;

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

mm^3 – milímetros cúbicos

mm – milímetro

μL – microlitro

μm – micrômetro

MODS – disfunção de múltiplos órgãos

NF- κ B – fator nuclear kappa-beta

P – pâncreas

PA – pancreatite aguda

PAF – fator de ativação plaquetária

PG-FISIOCIRURGIA – Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas

% – percentual

kg – quilograma

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TB – translocação bacteriana

TNF – fator de necrose tumoral

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UFC – unidades formadoras de colônia

UI – unidades internacionais

vs. – *versus*

1 – RESUMO

A pancreatite aguda apresenta alta taxa de morbimortalidade, notadamente quando associada a infecção da necrose pancreática. O mecanismo exato para esta ocorrência ainda não foi totalmente elucidado, mas, possivelmente, é oriunda da translocação bacteriana decorrente da disfunção da barreira intestinal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética com bactérias probióticas (BP) na resposta a pancreatite aguda (PA) induzida em ratos pela inoculação de taurocolato de sódio a 5% no ducto biliopancreático. Cinquenta ratos *Sprague-Dawley* foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos: 1 – operação simulada, com manipulação de órgãos intra-abdominais; 2 – indução de PA, sem suplementação de BP; 3 – suplementação dietética com BP, seguida por indução de PA; 4 – indução de PA, seguida por suplementação dietética com BP; e 5 – suplementação dietética com BP, antes e após a indução de PA. A suplementação de BP se deu pela administração por via intragástrica de 4×10^9 unidades formadoras de colônias (UFC), divididas em duas etapas por dia. Foram coletadas amostras sanguíneas para análise das concentrações séricas de amilase, lipase, glicose e cálcio, além de contagem leucocitária, imediatamente antes do procedimento, e após 24 e 48 horas. Após a morte dos animais, seguiu-se nova laparotomia para retirada de amostras de líquido peritoneal, linfonodo ileal, pâncreas, baço e fígado, para análise microbiológica e histopatológica. Na comparação simultânea entre os cinco grupos, foram observadas diferenças significativas para contagem leucocitária, na hora 24, e para amilasemia e lipasemia, nas horas 24 e 48 após a indução da PA. Considerando-se somente os grupos de animais em que ocorreu a indução de PA (grupos 2, 3, 4 e 5), não se observou diferença para quaisquer dos parâmetros avaliados. No que concerne à colonização

bacteriana dos órgãos, entre estes mesmos quatro grupos, também não se observou diferença. Quando considerados apenas os grupos de animais que receberam BP (grupos 3, 4 e 5), observou-se maior ocorrência de contaminação do linfonodo ileal e de hemorragia pancreática, em comparação aos demais grupos. Nossos resultados sugerem que a suplementação dietética com esta combinação de cepas de BP em animais submetidos a indução de PA não modifica o perfil dos marcadores bioquímicos avaliados e da contagem leucocitária, mas aumenta o índice de translocação bacteriana para o linfonodo ileal e a ocorrência de hemorragia pancreática.

2 – ABSTRACT

Acute pancreatitis presents high rates of morbidity and mortality, mainly when it is associated with infection of pancreatic necrosis. The mechanism of this occurrence has not been fully elucidated, but may possibly be due to the bacterial translocation caused by disruption of the intestinal barrier. The objective of the present study was to determine the effect of dietary supplementation with probiotic bacteria (PB) on acute pancreatitis (AP) induced in rats by the inoculation of 5% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. Fifty Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: 1 – sham-operated, with manipulation of intra-abdominal organs; 2 – induction of AP, without supplementation with PB; 3 – dietary supplementation with PB followed for induction of AP; 4 – induction of AP followed by dietary supplementation with PB; and 5 – dietary supplementation with PB before and after the induction of AP. 4×10^9 colony-forming units (CFU) of probiotic bacteria were directly administered into the stomach, divided into two stages per day. Blood samples were collected for the determination of serum levels of amylase, lipase, glucose, and calcium and for leukocyte counts immediately before (0 hour) and 24 and 48 hours after the surgical procedure. The animals were sacrificed and ileal lymph nodes and fragments of pancreas, spleen, and liver were obtained. Comparison of the five groups of animals revealed significant differences in leukocyte count at 24 hours and in amylasemia and lipasemia at 24 and 48 hours after AP induction. Considering only the groups with AP induction (groups 2, 3, 4, and 5), there was no difference in any of the parameters assessed or in bacterial colonization of the organs. When considering only the groups of animals that received PB (groups 3, 4, and 5), a greater occurrence of lymph node contamination and of pancreatic hemorrhage was observed compared to the other groups. The

present results suggest that dietary supplementation with this combination of PB in animals submitted to the induction of AP does not modify the profile of the biochemical markers evaluated or the leukocyte count, but increases the rate of bacterial translocation to lymph nodes and the occurrence of pancreatic hemorrhage.

3 – INTRODUÇÃO

Na pancreatite aguda (PA), após o início do processo agressor, ocorre ativação e liberação intersticial de enzimas pancreáticas, com desenvolvimento de processo inflamatório e autodigestão da glândula e de tecidos peripancreáticos.¹ Frequentemente, o início do quadro apresenta similaridade na maioria dos pacientes, com curso autolimitado, se o tratamento precoce é instituído.² Entretanto, em cerca de 25% dos casos pode ocorrer uma evolução desfavorável, com quadro de necrose pancreática extensa, associada com uma taxa de mortalidade que pode atingir 75% dos casos.²

A PA desenvolve uma complexa cascata de eventos imunológicos que afetam tanto a sua patogênese quanto o curso da doença.³ Atualmente, é amplamente aceito que a ativação precoce das enzimas digestivas dentro das células acinares é o evento crítico inicial que conduz à autodigestão pancreática, edema, danos vasculares, hemorragia e necrose.⁴

Independentemente do fator desencadeante, esta enfermidade pode evoluir em três fases: inflamação local, resposta inflamatória generalizada e, como estágio final, a disfunção de múltiplos órgãos (MODS).⁴ Uma série de moléculas, como mediadores inflamatórios, desempenham um papel fundamental na patogênese da PA e na resposta inflamatória sistêmica desencadeada. As citocinas liberadas parecem levar à ativação do sistema imune, propiciando aumento moderado da doença local e das complicações sistêmicas.⁴ Participam da fisiopatologia dessa enfermidade mediadores pró-inflamatórios (fator de necrose tumoral alfa – TNF- α , interleucina-1 β – IL-1 β , interleucina-6 – IL-6, fator de ativação plaquetária – PAF e interleucina-8 – IL-8) e antiinflamatórios (principalmente interleucina-10 – IL-10, fator complemento 5a – C5a, receptor antagonista da IL1– IL-1ra e interleucina 4 – IL-4),

sendo a expressão de inúmeros deles regulada por fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-beta (NF- κ B).^{3,5,6}

O NF- κ B é uma proteína que promove o aumento de múltiplos genes pela ativação da sua transcrição. Já está bem documentado que genes inflamatórios associados com o processo inflamatório e a resposta imune estão situados no domínio ligado a esse fator, que desempenha uma importante função em sua expressão.³ Portanto, a ativação do NF- κ B aumenta o recrutamento das células inflamatórias e a produção de mediadores pró-inflamatórios, exacerbando a resposta inflamatória.³

As complicações infecciosas têm sido consideradas as causas mais freqüentes de mortalidade em pacientes com PA, especialmente quando associada a infecção da necrose pancreática.^{7,8} A infecção pode determinar a ocorrência de sepse, uma persistente resposta inflamatória e, por último, a disfunção de múltiplos órgãos (MODS).⁹ O exato mecanismo pelo qual essa infecção ocorre ainda não está totalmente elucidado, porém estudos recentes sugerem que possa se dever à translocação bacteriana intestinal.¹⁰

O termo translocação bacteriana (TB) foi primariamente utilizado e definido por Berg e Garlington (1979),¹¹ e sustentado por outros autores,¹²⁻¹⁴ sendo definido como a passagem de microorganismos patogênicos e não-patogênicos e/ou de seus produtos, tais como endotoxinas, do lúmen intestinal, através da mucosa epitelial, para linfonodos mesentéricos e, possivelmente, para outros órgãos, como fígado, baço, pâncreas e para o sangue.¹¹⁻¹⁴

Mais recentemente, tem-se sugerido que a TB do lúmen intestinal se constitui na principal fonte de bactérias que alcançam e contaminam a necrose pancreática.^{10,15-17} Os microorganismos responsáveis pela infecção pancreática

secundária são, habitualmente, bactérias gram-negativas, como as que colonizam o trato gastrointestinal, o que corrobora a hipótese de disfunção da barreira intestinal.^{15,18,19} Assim, o intestino parece ser um dos principais órgãos implicados na evolução da PA para a sua forma mais grave.^{15,20,21}

Diante disto, estudos clínicos e experimentais têm aumentado o interesse acerca da fisiopatologia da TB na pancreatite aguda e nas suas causas prováveis. Como determinantes para a sua ocorrência, têm sido identificados e implicados alguns eventos que parecem acontecer precocemente após o início da PA, como: (1) o supercrescimento bacteriano no intestino delgado; (2) a falência da barreira intestinal; e (3) a resposta pró-inflamatória.^{13,16,19,22}

Como maior órgão imune do corpo, o papel do intestino não se restringe a proteger o organismo contra a invasão de bactérias luminiais, mas ele também atua como um órgão secretor de citocinas pró- e antiinflamatórias.²³ A submucosa intestinal desempenha um importante papel no mecanismo de defesa, mediante a ação de seus macrófagos e do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que é um dos principais produtores corporais de imunoglobulina A (IgA).^{24,25} A IgA secretória previne a penetração bacteriana na mucosa intestinal pela captura da bactéria no muco.²⁴ Em contraposição, a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes do intestino contribui, sobremaneira, para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), como parte da resposta geral do hospedeiro.²³

A integridade estrutural e funcional da mucosa intestinal, associada a uma flora adequada, representa uma barreira à invasão de microorganismos patogênicos, de antígenos e de componentes nocivos que possam estar presentes no lúmen

intestinal. Em indivíduos saudáveis, essa barreira é estável, exercendo sua função normal e assegurando resistência imunológica ao hospedeiro.²⁴

A microbiota intestinal constitui um mecanismo de defesa para o hospedeiro ainda pouco conhecido. Embora existam bactérias distribuídas ao longo de todo o intestino, sua maior concentração encontra-se no colón.^{26,27} No adulto saudável, essa microbiota é responsável por 35% a 50% do volume contido no colón, possui mais de 500 espécies diferentes que colonizam o trato gastrointestinal após o nascimento e permanece relativamente constante durante a vida.^{24,28}

Entretanto, a composição desta flora bacteriana intestinal pode sofrer influência de inúmeros fatores, como p.ex. condições fisiológicas do hospedeiro (idade e estresse), composição da dieta, circunstâncias ambientais (contaminação por patógenos, uso de medicamentos) e processo digestivo (pH, tempo de trânsito intestinal, disponibilidade de substratos).²⁴ Estes fatores podem induzir um desequilíbrio na flora (disbiose), caracterizado pelo declínio de bactérias benéficas e pelo aumento de bactérias potencialmente patogênicas.

A falência da barreira intestinal, decorrente da falta do estímulo funcional, da menor motilidade intestinal, da ausência de secreções, da diminuição na perfusão intestinal, da falta de suporte nutricional e de nutrientes específicos (prebióticos) para a nutrição de bactérias benéficas (probióticos), aliada ao supercrescimento bacteriano, parece constituir-se em via de contaminação pancreática contínua que ocorre nos pacientes com PA grave.^{16,23} Adicionalmente, na PA observa-se também uma disfunção da barreira endotelial, caracterizada pela perda da integridade capilar, resultando em permeabilidade capilar aumentada, exsudação plasmática e edema tecidual, além de superativação de células endoteliais, com aumento na produção e liberação de citocinas, de radicais livres de oxigênio e de leucotrienos.²⁹

Todos esses eventos contribuem para a falência da barreira intestinal e para a exacerbação da resposta sistêmica inflamatória na PA. Desta forma, a manutenção da homeostase intestinal constitui um fator preponderante na terapêutica na PA.²³

O uso profilático de antibióticos na PA, com o intuito de destruir a flora intestinal, evitando a TB para se prevenir as complicações infecciosas, vem sendo fonte de intenso debate. Estudos e uma recente meta-análise, a partir de seis estudos randomizados e controlados, levou à conclusão de que o uso profilático desses fármacos não previne a infecção da necrose pancreática e a mortalidade nessa doença.^{30,31} Além disso, o seu uso indiscriminado está associado a complicações, como infecções por fungos e resistência a esses fármacos,^{32,33} e inúmeras alternativas ao seu uso vêm sendo sugeridas, como a utilização de bactérias probióticas (BP).^{22,34}

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que exercem efeitos benéficos no organismo, quando ingeridos em número suficiente.^{26,35,36} Apresentam diversos mecanismos de ação, como antagonista a patógenos, efeito trófico nas mucosas, imunoestimulação do hospedeiro e inibição da produção de toxinas bacterianas.^{26,35-37} A estimulação da mucosa e do sistema imunológico do hospedeiro pelos probióticos foi evidenciada em estudos experimentais,^{38,39} e parece ocorrer a partir da capacidade de adesão dos microrganismos às células intestinais e da interação com o GALT.³⁵

No lúmen intestinal, algumas cepas probióticas previnem o supercrescimento de bactérias patogênicas, por meio da produção de ácido lático e por competição em seu crescimento.⁴⁰ Podem também preservar ou melhorar a função da barreira intestinal, pela prevenção da aderência bacteriana ao epitélio intestinal, inibição das

alterações patogênicas na permeabilidade intestinal e inibição das reações pró-inflamatórias estimuladas nos enterócitos por bactérias patogênicas.^{41,42}

Estudos em humanos, na vigência de PA, têm mostrado que a suplementação de probióticos determina taxas significativamente inferiores de abscesso pancreático e de infecção da necrose pancreática.^{34,43} Os probióticos podem, então, se constituir em uma importante ferramenta na prevenção da colonização pancreática e na redução da morbidade na PA grave.^{34,43}

Mangiante *et al* (2001) demonstraram, em ratos, a diminuição dos níveis séricos de marcadores de TB em linfonodos mesentéricos e em tecido pancreático, quando realizaram suplementação dietética com o probiótico *L. plantarum*, antes e após a indução de PA. Estes autores observaram que, no grupo de animais tratado com probióticos, apenas um dos 20 linfonodos apresentava colonização bacteriana, em contraposição a 14 linfonodos colonizados no grupo controle. Também foram detectadas colonizações bacterianas no tecido pancreático de dez animais do grupo controle, com as mesmas bactérias presentes nos linfonodos.⁴⁴ Os resultados deste estudo não somente sugerem o efeito protetor do probiótico, como também suportam a teoria da TB na patogênese da infecção da necrose pancreática.

Similarmente, Van Minnen *et al* (2007), em estudo experimental com indução de PA em ratos suplementados com multiespécies de BP, antes e após a indução da PA, mostraram redução do crescimento de bactérias patogênicas no grupo intervenção e da ocorrência de TB para outros órgãos, principalmente para o pâncreas, resultando em diminuição da morbimortalidade.⁴⁵ Entretanto, parece existir um limiar para modulação da barreira intestinal pelos probióticos, uma vez que não parece ocorrer proteção após ocorrer a sua ruptura.²³

A importância da manutenção de uma flora intestinal adequada foi reconhecida há longo tempo, despertando a atenção da comunidade científica para a utilização de nutrientes funcionais, como as BP. Contudo, apenas recentemente se ateuve especificamente ao seu potencial como agentes preventivos e terapêuticos em doenças do trato gastrointestinal. Assim, considera-se relevante avaliar os efeitos da suplementação de bactérias probióticas, antes e após a indução da PA em ratos, e a sua repercussão nos níveis séricos de marcadores habitualmente utilizados nessa enfermidade e na ocorrência de TB.

4 – OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a ação da suplementação dietética com bactérias probióticas na resposta a pancreatite aguda induzida em ratos.

Objetivos específicos

Verificar se a suplementação dietética com bactérias probióticas modifica o perfil de marcadores séricos habitualmente utilizados na avaliação prognóstica e no acompanhamento da pancreatite aguda.

Determinar se a suplementação dietética com bactérias probióticas previne ou diminui a TB intestinal na pancreatite aguda.

5 – MÉTODO

Utilizou-se um modelo experimental com ratos *Sprague-Dawley* submetidos a indução de pancreatite aguda por inoculação de taurocolato de sódio a 5% (Taurocholic acid[®] – Sigma[®]) no ducto biliopancreático, com ou sem suplementação de bactérias probióticas (BP). Foram coletadas amostras sangüíneas dos animais, no momento da indução da pancreatite aguda ou da operação simulada e após 24 e 48 horas, para análise sérica dos níveis de amilase, lipase, glicose e cálcio e para contagem de leucócitos. Realizou-se análise microbiológica no linfonodo ileal e em segmentos de pâncreas, baço e fígado para a identificação de microorganismos aeróbicos. Também se procedeu à análise morfológica, sob microscopia óptica (Olympus[®] BX51), de segmento pancreático, avaliando a presença ou ausência de esteatonecrose, lise acinar, hemorragia e infiltrado leucocitário.

Todos os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e receberam ração apropriada para ratos (Focus 1722 Roedores[®] – Agroceres) e água *ad libitum*.

Os ratos foram alojados em gaiolas individuais, em biotério climatizado, com foto-períodos diários de 12 horas.

A experimentação foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental, com a colaboração de docentes das Disciplinas de Anatomia Patológica e de Microbiologia, e do Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

5.1 – ANIMAIS E GRUPOS

Foram utilizados 50 ratos *Sprague-Dawley* machos adultos, com peso inicial entre 240 e 280 g. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos, cada um com dez animais, a saber:

- 1 – controle – operação simulada, com manipulação de órgãos intra-abdominais;
- 2 – indução de pancreatite aguda, sem suplementação dietética com BP;
- 3 – suplementação dietética com BP durante sete dias, seguida por indução de pancreatite aguda;
- 4 – indução de pancreatite aguda, seguida por suplementação dietética com BP por dois dias;
- 5 – suplementação dietética com BP antes, durante sete dias, e após a indução de pancreatite aguda, durante dois dias.

5.2 – COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO

A ração padrão utilizada (Focus 1722 Roedores[®] – Agrocere) continha: fósforo (mínimo) – 0,8%; proteína bruta (mínimo) – 22%; extrato etéreo (mínimo) – 4%; matéria fibrosa (máximo) – 8%; matéria mineral (máximo) – 9%; cálcio (máximo) – 1,4%; e umidade (máximo) – 13%. Ela era enriquecida com vitamina A, vitamina E, vitamina K₃, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, vitamina B₁₂, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, DL-metionina, lisina, aditivo antioxidante, ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio e cobalto.

5.3 – SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

A suplementação dietética com BP nos diferentes grupos de animais (3, 4 e 5), no período pré-determinado (durante sete dias pré-indução e/ou dois dias pós-indução de pancreatite aguda), foi realizada pela administração por via intragástrica de 4×10^9 unidades formadoras de colônias (UFC), dividida em duas etapas por dia, em *bolus*, com a utilização de um cateter orogástrico, sempre no mesmo horário.

Os grupos de animais estipulados para não receberem a suplementação de BP (1 e 2) receberam o mesmo volume de água, administrados na forma e período similares, para que todos os ratos fossem submetidos à mesma manipulação que os animais dos grupos-intervenção.

Para a administração das BP, foi utilizado o *Ther-Biotic™ Complete* (Klaire Labs®), que é composto por *Lactobacillus rhamnosus*, (*L. rhamnosus*) *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. brevis* e *Streptococcus thermophilus*. O produto é comercializado em cápsulas que contêm, cada uma, 6×10^9 , 3×10^9 , $2,5 \times 10^9$, $2,0 \times 10^9$, 2×10^9 , 1×10^9 , $0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 5×10^9 , $0,5 \times 10^9$, $0,5 \times 10^9$ e 1×10^9 de UFC das bactérias supracitadas, respectivamente, em cada cápsula.

De forma a atingir a concentração desejada (4×10^9 UFC), o conteúdo de cada cápsula foi dissolvido em 31 ml de água destilada estéril e cada animal dos grupos 3, 4 e 5 recebeu 2,5 ml da solução, duas vezes por dia, diariamente, de acordo com o estipulado para cada grupo-intervenção.

5.4 – CONTROLE DE PESO E DE INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA

O peso dos ratos, bem como a ingestão de ração e água, foram avaliados diariamente, sempre no mesmo horário. O peso dos animais foi aferido em balança

de precisão (AdventureTM – Ohaus). O consumo de ração foi mensurado pelo controle do resto-ingestão da ração fornecida. A água foi ofertada em recipientes graduados em mililitros, sendo o consumo também aferido pelo controle do resto-ingestão.

5.5 – INDUÇÃO DA PANCREATITE AGUDA

Após jejum de 12 horas, os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia com cetamina (Cloridrato de Cetamina a 10%[®] – Agener), na dose de 80 mg/kg, e xilazina (Calmiun[®] – Agener), na dose 12 mg/kg, por via intraperitoneal, e posterior tricotomia da parede abdominal. A anti-sepsia da parede abdominal foi realizada com solução de iodopovidona com 1% de iodo ativo (Povidine degermante[®] – JohnsonDiversey) e, em seguida, com solução de iodopovidona com 10% de iodo ativo (Povidine alcoólico[®] – Sidepal). Todo o procedimento foi realizado sob condição estéril, com utilização de um *kit* de instrumentos cirúrgicos para cada animal, obedecendo-se a todos os cuidados de assepsia e anti-sepsia.

Os animais foram fixados na mesa operatória e submetidos a laparotomia mediana supra-umbilical, com cerca de 3 cm de extensão.

Nos animais do grupo 1, foi realizada apenas a manipulação dos órgãos intra-abdominais, seguida do fechamento da cavidade abdominal.

Nos animais dos grupos 2, 3, 4 e 5, depois de aberta a cavidade abdominal, o fígado dos animais foi posicionado superiormente, para visualização do ducto biliopancreático. O ducto foi dissecado e reparado com fio de linho 2-0 (Linho[®] – Ethicon[®]). Para a melhor visualização das estruturas anatômicas, utilizou-se uma lupa RT 202.03 (Ritek[®] – Taiwan), para ampliação da imagem (5x).

A PA foi induzida pela inoculação de 0,2 μ L de taurocolato de sódio a 5% (Taurocholic acid[®] – Sigma) no ducto biliopancreático dos animais, com agulha 0,45 x 13 cm (Plascalp[®]) acoplada a uma seringa com capacidade para 1 ml (3/10cc – BD[®]), a uma taxa de infusão de 0,1 μ L/min, sob pressão manual. Para manter constante e amortecer a pressão de infusão da substância, foi criada uma câmara gasosa no interior da seringa. (Figura 1)

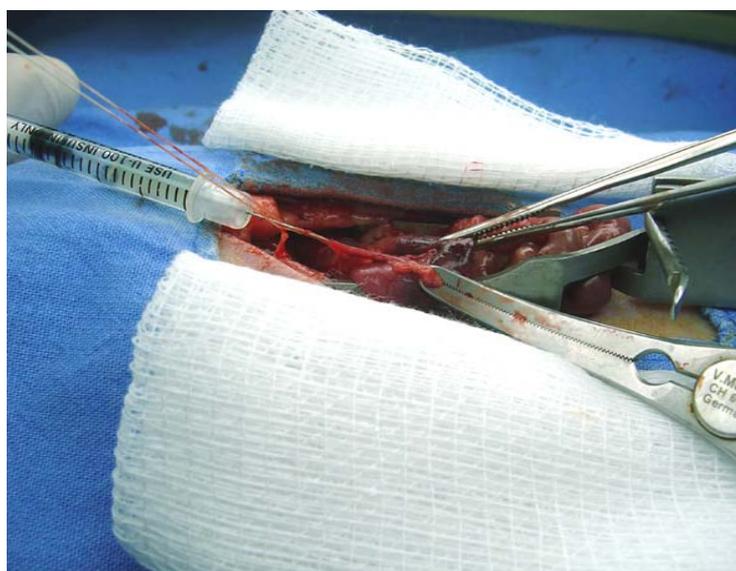


Figura 1. Indução de PA: inoculação do taurocolato de sódio a 5% no ducto biliopancreático de rato.

Em todos os grupos de animais, ao se proceder ao fechamento da parede abdominal, (em dois planos – peritônio-aponeurótico e pele, com fio de sutura de poliglecaprona 3-0 [Prolene[®] – Ethicon]), foram inoculados 50 ml/kg de solução de cloreto de sódio a 0,9% no tecido celular subcutâneo. Esta inoculação foi repetida diariamente, até a morte dos animais, com o intuito de se manter uma hidratação adequada.

Após a recuperação anestésica, os animais tiveram acesso irrestrito apenas a água, e foram mantidos em gaiolas individuais.

5.6 – COLETA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Sob anestesia com cetamina (Cloridrato de cetamina a 10%[®] – Agener) e xilazina (Calmun[®] – Agener), por via intraperitoneal, foram coletadas amostras sanguíneas dos animais, por punção cardíaca, para análise sérica de amilase, lipase, glicose, cálcio e para contagem de leucócitos. A primeira amostra foi coletada imediatamente antes da indução da PA (hora 0). Mais duas amostras foram coletadas, após 24 e 48 horas da indução da PA.

A punção cardíaca foi realizada com agulha 0,45 x 13 cm (Plascalp[®]), acoplada a uma seringa de 5 ml (Injet[®] – Plascalp). No local da punção, realizou-se anti-sepsia com solução de iodopovidona com 10% de iodo ativo (Povidine alcoólico[®] – Sidepal).

O sangue coletado foi imediatamente acondicionado em tubos específicos, a saber:

- *Vacutainer* (Vacuette[®]), com capacidade para 4 ml, com anticoagulante EDTA – 0,5 ml, para a contagem de leucócitos;
- *Vacutainer* (Vacuette[®]), com capacidade para 8 ml, com gel separador por densidade e sem anticoagulante – 1,5 ml, para as dosagens bioquímicas.

Após a coleta sanguínea, os tubos foram acondicionados em recipientes térmicos e encaminhados diretamente para a realização das análises laboratoriais.

5.7 – ANÁLISE LABORATORIAL

A análise laboratorial foi realizada no laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), por profissional capacitado que não tinha conhecimento dos grupos de animais em estudo.

Para a análise laboratorial, foram utilizados os seguintes métodos:

- Contagem de leucócitos – impedância;
- Glicose – glicose oxidase/peroxidase;
- Cálcio – azul de metiltimol – MTB;
- Amilase – substrato direto;
- Lipase – 6-metilresorufina.

Para a análise dos níveis séricos de glicose, cálcio e amilase, foi utilizado o equipamento analisador automático A15[®] (BioSystems[®]), com emprego do *kit* reagente BioSystems[®]; para análise dos níveis séricos da lipase, foi utilizado o mesmo analisador automático, com emprego do *kit* reagente Roche[®]; para a contagem leucocitária, utilizou-se o equipamento contador hematológico automatizado KX-21N (Sysmex[®]).

5.8 – REMOÇÃO DAS PEÇAS OPERATÓRIAS

Logo após a última coleta sangüínea (48 horas após a laparotomia inicial), sob anestesia com cetamina (Cloridrato de cetamina a 10%[®] – Agener) e xilazina (Calmium[®] – Agener), por via intraperitoneal, procedeu-se a nova laparotomia mediana para abertura da cavidade abdominal do animal para a coleta de líquido

peritoneal, de linfonodo ileal e de fragmentos de pâncreas (dois fragmentos), fígado e baço para análise histológica e microbiológica.

Após a remoção das amostras, os animais foram mortos por sobredose anestésica e submetidos ao fechamento da parede abdominal em dois planos (peritônio-aponeurótico e pele), com fio de sutura de poliglecaprona 3-0 (Prolene[®] – Ethicon).

5.9 – ESTUDO MORFOLÓGICO

O tecido pancreático foi processado em soluções crescentes de álcool e xilol, e, em seguida, incluído em blocos de parafina e cortado, com o auxílio de um micrótomo (Olympus[®] cut 4060), em fatias de 4 µm de espessura. As lâminas, preparadas a partir dessas fatias, foram submetidas a coloração por hematoxilina e eosina. Após as colorações, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus[®] BX51).

Para a avaliação histopatológica da PA, foram verificadas a presença ou ausência dos seguintes parâmetros: esteatonecrose, lise acinar, hemorragia e infiltrado leucocitário. A estes parâmetros, atribuiu-se uma graduação, de acordo com a intensidade de acometimento individual do parênquima pancreático dos animais: 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; e 3 – acentuado.

5.10 – ESTUDO MICROBIOLÓGICO

O líquido peritoneal foi coletado com agulha (0,80 x 30 mm), acoplada a seringa de 3 ml (Injet[®] – Plascalp) e acondicionado em frascos estéreis (Ependorff), com capacidade para 1,5 ml. O linfonodo ileal e os segmentos de pâncreas, baço e

fígado também foram colocados em frascos estéreis (Ependorff) e submetidos a cultura para microorganismos aeróbicos.

Imediatamente após chegarem ao laboratório, as amostras foram armazenadas em geladeira, à temperatura de 6 °C. O intervalo de tempo decorrido entre a chegada do material no laboratório e a realização dos procedimentos para a cultura bacteriana não excedeu o período de três horas.

Um fragmento de aproximadamente 2 mm de cada órgão foi colocado em um tubo de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI[®] – Oxoid Ltd, Basingstoke – Hampshire, Inglaterra) e incubado a uma temperatura de 36 °C, durante 24 horas. Após esse período, foi observada a presença de crescimento bacteriano e identificado o tubo correspondente. Apenas dos tubos onde ocorreu o crescimento bacteriano, foram retirados 0,01 ml da solução, com o uso de alça calibrada, que foram transferidos, imediatamente, para outro tubo contendo caldo BHI[®]. Após 24 horas, foi observada a presença de crescimento bacteriano e identificado o tubo correspondente.

As amostras crescidas foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Agar-sangue (Oxoid Ltd[®], Basingstoke – Hampshire, Inglaterra) e incubadas por mais 24 horas. Em seguida, foi executado o método de coloração de Gram, para separá-las em grupos distintos. Ambas as amostras, Gram-positivas e Gram-negativas, foram submetidas a provas bioquímicas específicas.

As amostras Gram-negativas foram isoladas em placa de Petri contendo o meio de cultura *Cystine Lactose Electrolyte Deficient* (CLED[®]). Após 24 horas de incubação em estufa a 36 °C seguiram-se as provas bioquímicas específicas. Para as amostras Gram-positivas, foram aplicados os testes da catalase (H₂O₂) e da coagulase (plasma de coelhos não imunizados).

Para as amostras Gram-negativas – *enterobactérias* – foram aplicados os seguintes testes bioquímicos: S.I.M – sulfeto (H₂S)-indol-mobilidade (Merck KGaA[®] – Darmstadt, Alemanha), D.A.U. – duplo açúcar (glicose e lactose) + uréia⁴⁶ e Ágar Citrato Seg Simmons (Merck[®] – Brasil) e CITRATO (Moeller Decarboxylase[®] – Becton Dickinson SA – França).

Para as amostras Gram-negativas – *não fermentadoras* – foram utilizados os seguintes testes bioquímicos: Base Descarboxilase – Arginina (Moeller Decarboxylase[®] – Becton Dickinson SA – França), ORNITINA (Moeller Decarboxylase[®] – Becton Dickinson SA – França) e LISINA (Moeller Decarboxylase[®] – Becton Dickinson SA – França) e OF glicose (Hugh-Leifson – Merck KGaA[®] – Darmstadt, Alemanha).

5.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação das médias dos pesos corporais, da ingestão de água e do consumo de ração dos animais entre os grupos, assim como para a avaliação do efeito da suplementação das BP sobre os marcadores bioquímicos e sobre a contagem leucocitária, foi realizado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de *Dunn* (utilizado para comparação dos grupos de animais, dois a dois).

Para avaliar o efeito da suplementação de BP sobre a TB, considerando-se o percentual de contaminação dos órgãos (pâncreas, fígado, baço, linfonodo ileal) e líquido peritoneal dos animais, e na avaliação da gravidade dos parâmetros histopatológicos (proteólise, esteatonecrose, hemorragia e infiltrado leucocitário) entre os animais de todos os grupos de estudo e na comparação entre dois grupos (sem e com suplementação de BP), foi utilizado o teste exato de Fisher.

Para todas as análises, foi estabelecido um valor de $p \leq 0,05$ como critério para a rejeição da hipótese nula de similaridade dos grupos.

5.12 – ASPECTOS ÉTICOS NOS CUIDADOS COM ANIMAIS

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais.^{47,48}

6 – RESULTADOS

6.1 – EVOLUÇÃO DOS ANIMAIS

Sete animais evoluíram para óbito, dois do grupo 1 (operação simulada), dois do grupo 2 (indução de PA, sem suplementação de bactérias probióticas), um do grupo 3 (suplementação de bactérias probióticas antes da indução de PA) e dois do grupo 4 (suplementação de bactérias probióticas após indução de PA), todos após a coleta da primeira amostra sangüínea. A necropsia desses animais revelou a presença de grande quantidade de coágulos sangüíneos no saco pericárdico, sugerindo a ocorrência de tamponamento cardíaco, decorrente da punção cardíaca realizada para a coleta de sangue. Nesses grupos, os animais que evoluíram para óbito foram excluídos das análises.

Todos os demais animais apresentaram recuperação satisfatória após o procedimento cirúrgico e as primeiras coletas sangüíneas. A partir daí, e até 48 horas após, começaram a apresentar ascite e progressiva prostração.

6.2 – EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL, INGESTÃO DE ÁGUA E DE RAÇÃO

6.2.1 – Peso corporal

Não houve diferença no peso corporal dos animais dos cinco grupos, tanto no início do experimento (D1 – dia do início do experimento) quanto no momento da operação simulada nos animais do grupo 1 e da indução da pancreatite aguda nos animais dos grupos 2, 3, 3 e 5 (D7). No que se refere à comparação das médias dos pesos dos animais nos cinco grupos, também não foi observada diferença significativa. Os valores dessas variáveis, assim como os desvios-padrão, podem ser observados na tabela 1. A evolução dos pesos médios dos animais entre D1 e D7 pode ser observada na figura 2.

6.2.2 – Ingestão de água e de ração

Não se observou diferença na ingestão média tanto de água quanto de ração entre os diversos grupos de animais, entre D1 e D7. (Tabela 1)

Tabela 1. Valores de média \pm desvio padrão das seguintes variáveis: consumo médio de ração e de água, peso corporal médio e peso corporal em D1 e D7, nos cinco grupos de animais.

Variável	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Teste de Kruskal- Wallis (p)
Consumo médio diário de ração (g)	19,73 \pm 1,97	20,05 \pm 2,18	20,75 \pm 2,64	20,19 \pm 2,52	20,51 \pm 1,92	0,82
Consumo médio diário de água (ml)	43,69 \pm 3,35	43,75 \pm 6,03	42,90 \pm 4,89	42,3 \pm 6,84	43,01 \pm 3,00	0,89
Peso corporal médio (g)	275,20 \pm 20,24	271,63 \pm 10,79	268,70 \pm 11,82	262,79 \pm 14,64	268,85 \pm 8,98	0,65
Peso corporal médio em D1 (g)	270,46 \pm 18,55	264,62 \pm 12,51	262,46 \pm 12,4	258,42 \pm 11,34	262,92 \pm 9,17	0,51
Peso corporal médio em D7 (g)	279,02 \pm 21,14	277,06 \pm 11,37	273,77 \pm 13,93	257,63 \pm 43,60	272,39 \pm 12,65	0,69

g – grama; ml – mililitros; \pm – desvio padrão

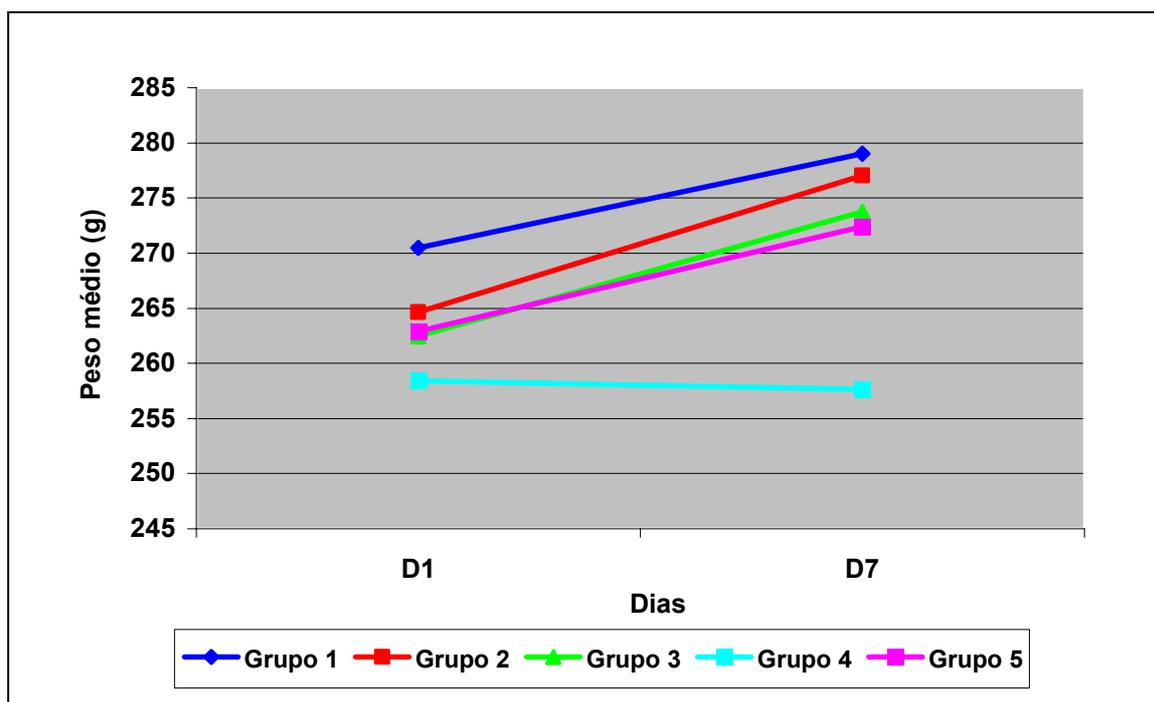


Figura 2. Evolução do peso corporal médio dos animais, entre D1 e D7.

6.3 – EVOLUÇÃO DOS RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS

Na 24^a hora após a primeira coleta sanguínea (hora 24), foi observada diferença significativa na contagem leucocitária ($p=0,02$) na comparação simultânea entre os cinco grupos de animais. Pelo pós-teste de Dunn, verificou-se que a diferença existente na 24^a hora ocorreu apenas entre os grupos 1 e 2 ($p<0,05$). Nos demais momentos (horas 0 e 48), os valores médios da contagem leucocitária para os cinco grupos de animais foram similares ($p>0,05$). (Figura 3) Os valores dessas variáveis, assim como os desvios-padrão, podem ser visualizados na tabela 2.

Na análise das médias dos valores de glicemia dos cinco grupos, verificou-se que não houve diferença significativa em nenhum dos três momentos (horas 0, 24 e 48) das coletas sanguíneas. (Figura 4)

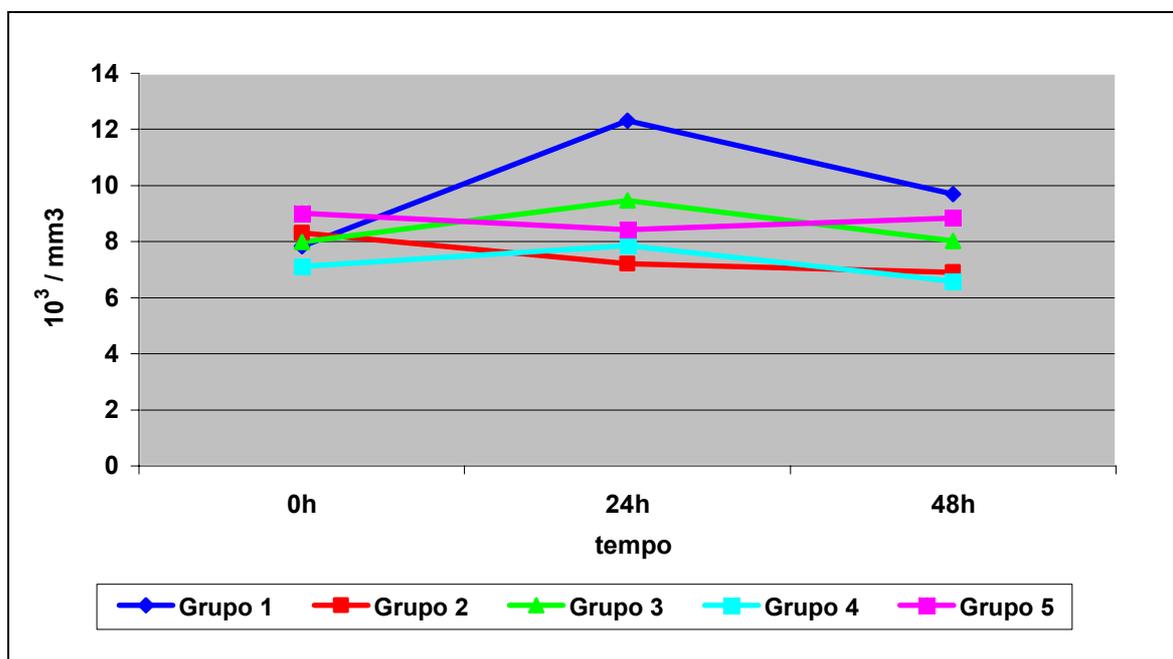


Figura 3. Evolução da contagem leucocitária média, por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.

Os níveis séricos de amilase foram similares na comparação simultânea entre os cinco grupos de animais na hora 0, mas diferentes nas horas 24 e 48 ($p=0,0001$ e $p=0,039$, respectivamente). Ao se realizar as comparações entre os grupos (dois a dois), em cada momento, observou-se que na 24^a hora ocorreu diferença entre os animais dos grupos 1 e 2, grupos 1 e 3 e grupos 1 e 4 ($p<0,05$), enquanto na 48^a hora observou-se diferença apenas entre os ratos dos grupos 1 e 2 ($p<0,05$). (Figura 5A)

Tabela 2. Valores médios dos resultados dos exames laboratoriais nos cinco grupos de animais.

Variável	Coleta sangüínea (hora)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Teste de Kruskal- Wallis (p)
Leucócitos (10³/mm³)	0	7,83 ± 1,24	8,30 ± 2,21	7,98 ± 0,93	7,11 ± 1,12	9,01 ± 2,24	0,14
	24	12,30 ± 2,19	7,20 ± 3,03	9,75 ± 3,35	7,85 ± 3,04	8,42 ± 2,06	0,02
	48	9,70 ± 3,74	6,91 ± 2,75	8,03 ± 2,91	6,57 ± 1,90	8,84 ± 6,24	0,35
	0	161,50 ± 29,64	193,25 ± 39,97	180,55 ± 21,40	186,00 ± 26,91	171,90 ± 46,68	0,33
	24	105,62 ± 12,10	117,62 ± 29,21	123,22 ± 32,29	108,75 ± 29,85	115,50 ± 32,38	0,80
	48	229,37 ± 92,84	164,37 ± 100,51	150,66 ± 35,16	152,50 ± 47,83	159,70 ± 49,30	0,17
Amilase (UI/l)	0	531,62 ± 84,74	584,00 ± 98,39	546,77 ± 102,00	529,62 ± 97,20	456,00 ± 128,80	0,24
	24	497,50 ± 74,21	4379,12 ± 3641,48	4566,22 ± 2745,08	4577 ± 4020,59	2878,10 ± 3870,23	0,0001
	48	778,75 ± 134,21	3441,37 ± 4990,21	2548,33 ± 2267,61	1209,37 ± 550,90	1479,70 ± 1642,98	0,039
	0	13,12 ± 2,85	13,12 ± 3,64	8,88 ± 5,68	11,62 ± 4,13	8,44 ± 4,24	0,08
	24	11,25 ± 1,98	202,87 ± 305,76	162,66 ± 202,93	319,50 ± 662,59	85,50 ± 146,40	0,0003
	48	11,12 ± 1,88	101,5 ± 161,17	63,75 ± 49,87	40,71 ± 28,25	32,70 ± 38,04	0,005
Cálcio (mg/dl)	0	9,63 ± 0,44	9,32 ± 0,81	9,62 ± 0,39	9,12 ± 0,87	9,75 ± 1,01	0,61
	24	9,48 ± 1,03	9,21 ± 0,92	9,08 ± 0,96	8,90 ± 0,74	9,07 ± 0,95	0,80
	48	9,64 ± 0,57	9,92 ± 0,92	9,78 ± 0,90	9,52 ± 0,79	9,46 ± 0,84	0,78

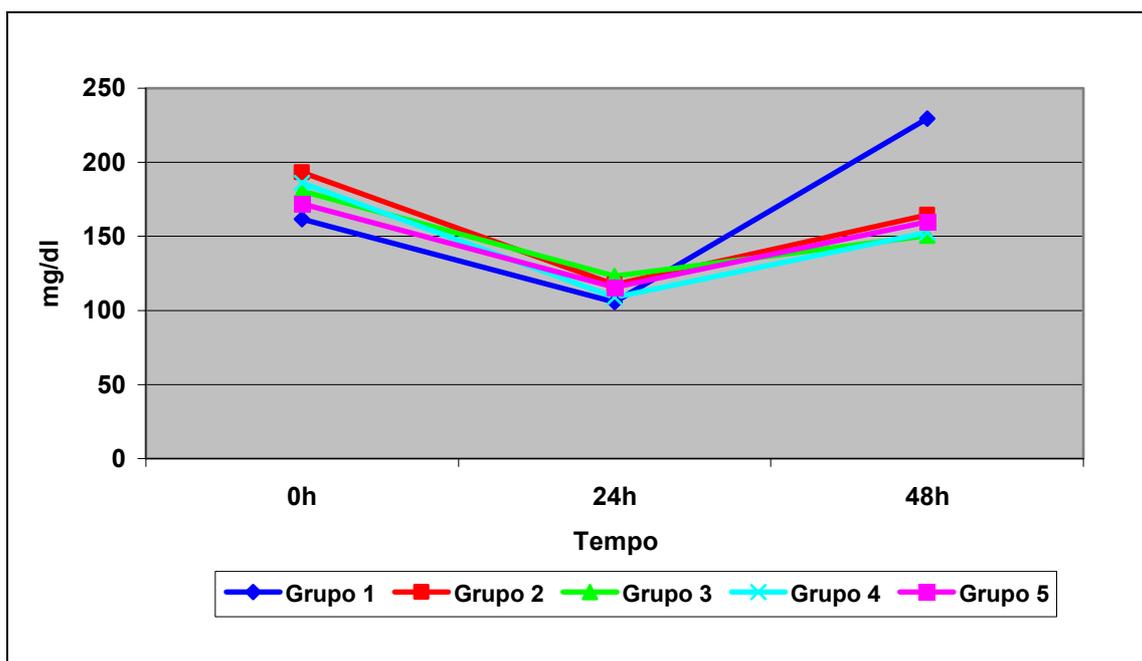


Figura 4. Evolução dos níveis séricos médios de glicose, por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.

Os valores médios dos níveis séricos de lipase seguiram o mesmo delineamento observado com os níveis de amilase. Na hora 0, não houve diferença entre nenhum dos grupos analisados. Nas horas 24 e 48, os valores encontrados na análise entre os cinco grupos, apresentaram diferença significativa, com $p=0,0003$ e $p=0,005$, respectivamente. Na comparação entre grupos (dois a dois) na hora 24 observou-se diferença entre os grupos 1 e 2, grupos 1 e 3 e grupos 1 e 4 ($p<0,05$), e, na hora 48, somente foi observada diferença entre os grupos 1 e 2 ($p<0,05$). (Figura 5B)

Na avaliação dos níveis séricos de cálcio, não foi observada diferença significativa entre os cinco grupos analisados, em nenhum dos três momentos de coleta sanguínea. (Figura 6)

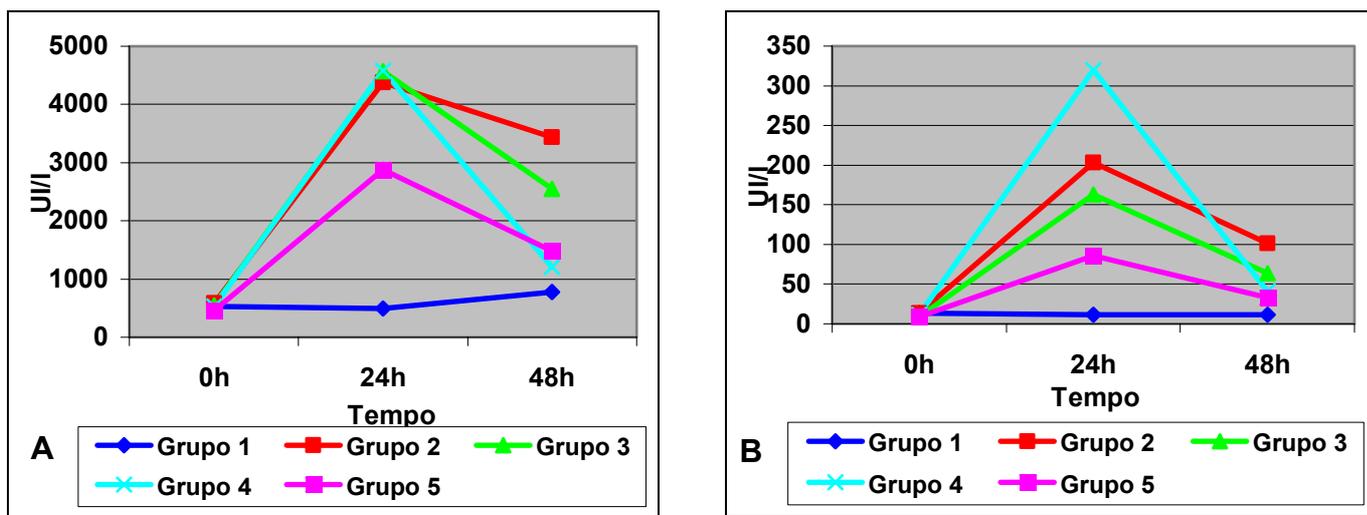


Figura 5. Evolução dos valores médios dos níveis séricos de amilase (A) e de lipase (B), por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.

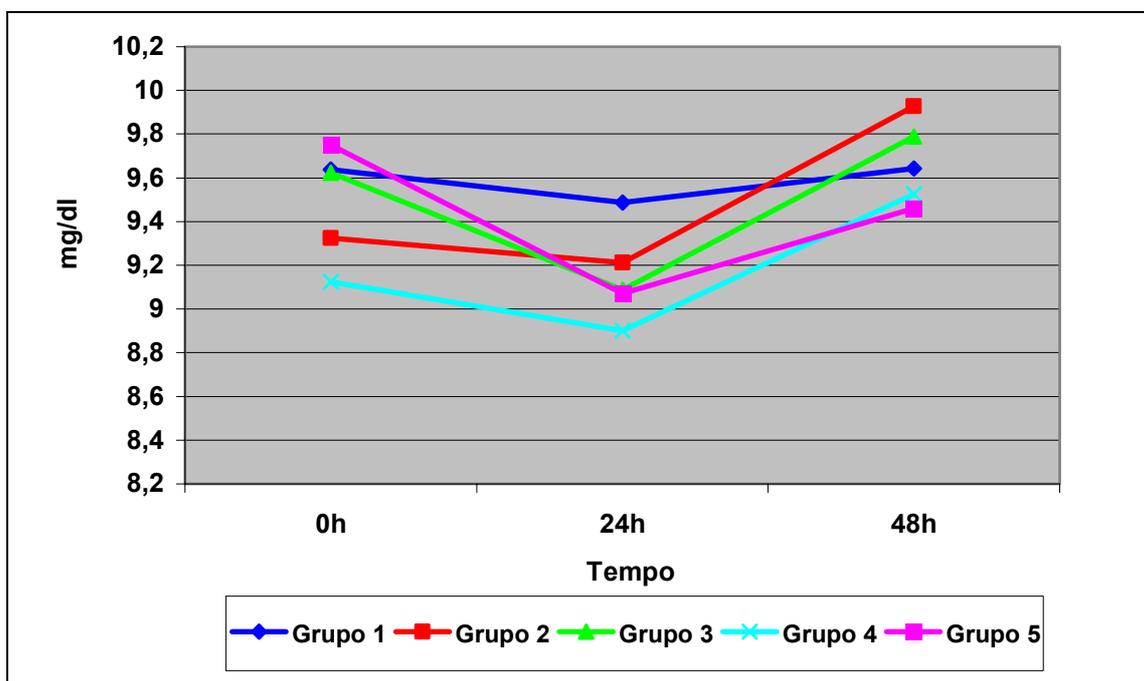


Figura 6. Evolução do nível sérico médio de cálcio, por grupo de estudo, até 48 horas após o procedimento cirúrgico.

Após a realização da análise simultânea entre os cinco grupos, foi realizada nova análise somente entre os grupos que foram submetidos a indução de pancreatite aguda (grupos 2, 3, 4 e 5), onde não foi observada diferença significativa nos parâmetros analisados, em nenhum dos três momentos de coleta sanguínea (horas 0, 24 e 48). Os resultados obtidos pela análise simultânea entre os grupos de animais que foram submetidos a indução de PA para os parâmetros que apresentaram diferença na análise simultânea entre todos os cinco grupos foram: contagem leucocitária na hora 24: $p=0,43$; amilaseemia nas horas 24 e 48: $p=0,09$ vs $p=0,16$ respectivamente; e, lipaseemia nas horas 24 e 48: $p=0,14$ vs $p=0,19$ respectivamente. Assim, ao se retirar os animais do grupo 1 da análise, não se observaram as diferenças encontradas entre os cinco grupos para os valores médios de leucócitos na hora 24 e para os valores médios de amilaseemia e de lipaseemia 24 e 48 horas após a indução de PA.

6.4 – ESTUDO MORFOLÓGICO

Na análise histopatológica, foram avaliados a gradação de quatro parâmetros: esteatonecrose, proteólise, hemorragia e infiltrado leucocitário.

No momento da coleta do fragmento pancreático, observou-se, macroscopicamente, necrose, edema, focos de hemorragia e presença de líquido na cavidade peritoneal na maioria dos animais, exceto os do grupo 1 (operação simulada). Em muitos animais, também se observou a ocorrência de esteatonecrose no parênquima pancreático, correspondendo às lesões denominadas “pingos de vela” (Figura 7).

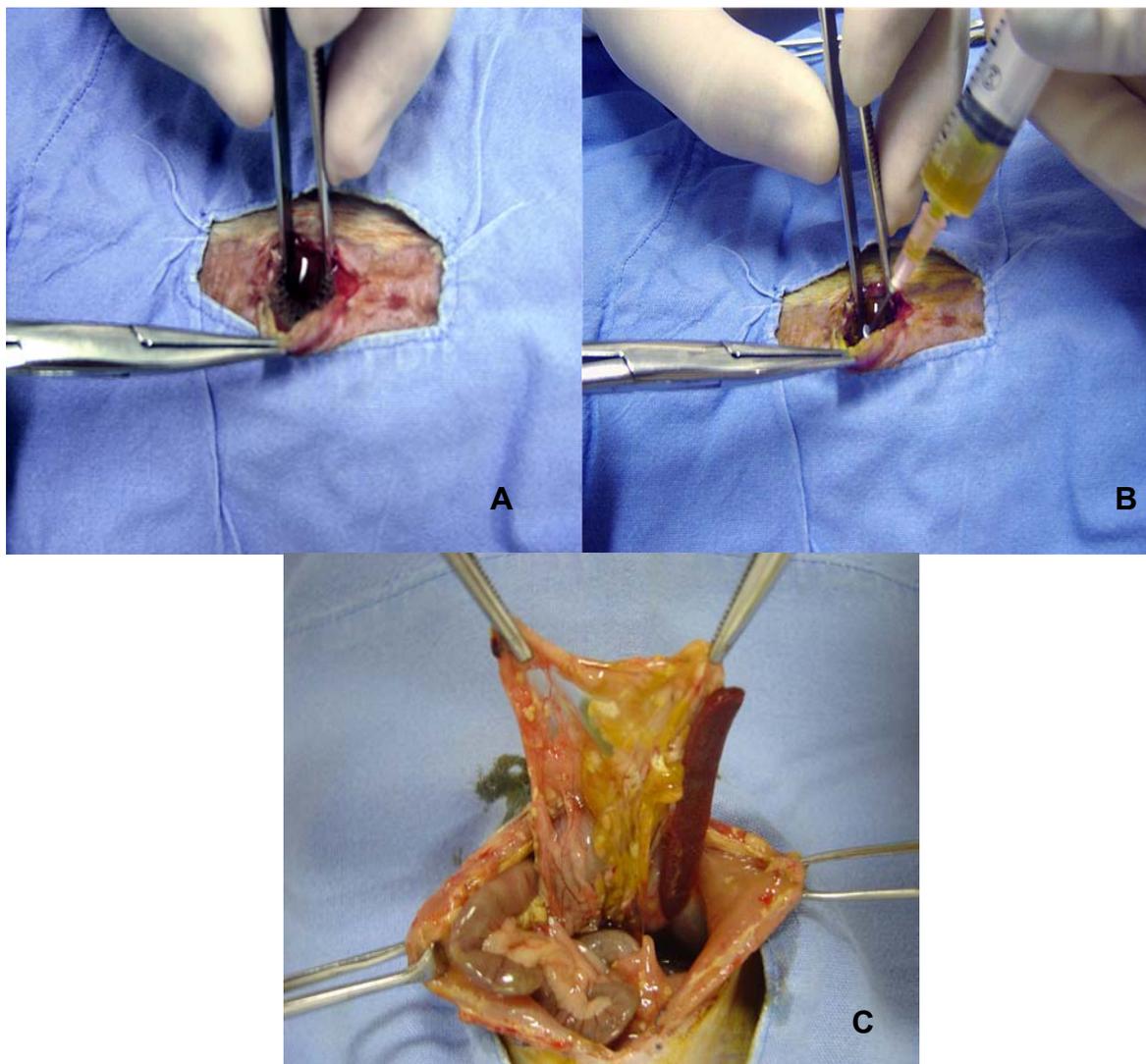


Figura 7. Pancreatite aguda induzida nos animais: A e B – presença de grande quantidade de líquido na cavidade peritoneal; C – aspecto morfológico do parênquima pancreático, com lesões em “pingos de vela”.

À avaliação microscópica, não foram observadas alterações nos animais do grupo 1; entretanto, nos demais grupos, foram observadas áreas com alterações acinares, esteatonecrose, infiltrado leucocitário e hemorragia; este último parâmetro foi encontrado, especialmente, nos grupos de animais com suplementação de BP. (Figura 8) Contudo, em todos os grupos de animais com indução de PA, somente foram observadas lesões focais do pâncreas.

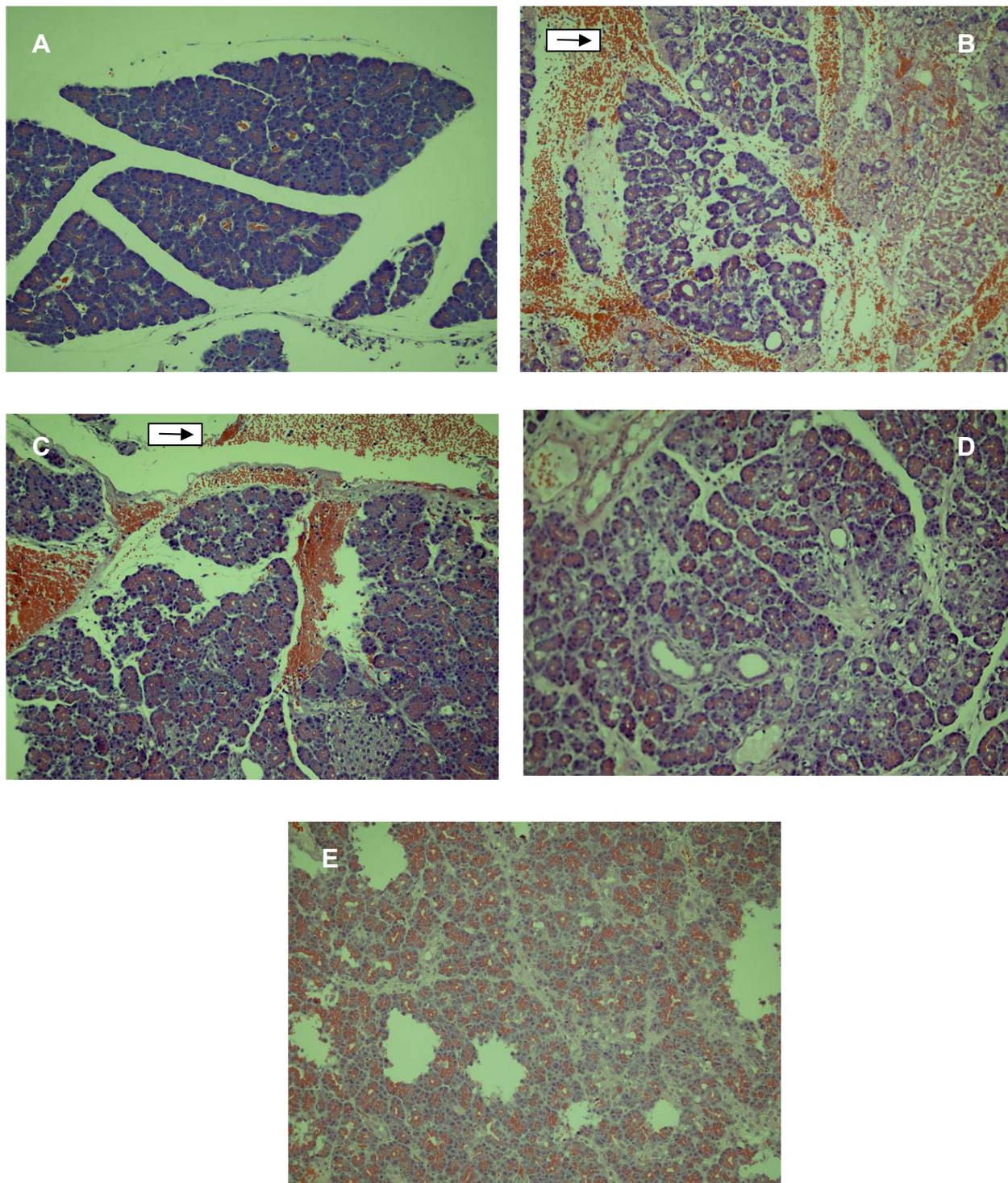


Figura 8. Fotomicrografias de tecido pancreático dos animais: A – grupo 1 – tecido pancreático normal; B, C, D, E – grupos 2, 3, 4 e 5, respectivamente – extensas lesões acinares, com áreas de hemorragia. Em B e C, identificam-se áreas de hemorragia (setas).

Na análise histopatológica do segmento pancreático dos animais, observou-se a ocorrência dos parâmetros analisados, de acordo com sua gravidade. Como demonstrado na tabela 3, observa-se que, dentre os parâmetros analisados, a presença de hemorragia pancreática apresentou diferença significativa entre os quatro grupos ($p=0,04$), com maior ocorrência nos grupos com suplementação de BP. Entretanto, os demais parâmetros (esteatonecrose, proteólise e infiltrado leucocitário) se mostraram similares entre os grupos, independente dos animais terem sido ou não suplementados com BP.

Tabela 3. Percentual da ocorrência de alterações histopatológicas nos animais dos grupos submetidos a indução de pancreatite aguda (grupos 2, 3, 4 e 5), de acordo com o acometimento do segmento pancreático.

Avaliação histopatológica	Gravidade	Grupos de animais				Teste exato de Fisher (p)
		2	3	4	5	
Proteólise	Ausente	0,0	0,0	25,9	10,0	0,10
	Leve	50,0	55,6	25,0	50,0	
	Moderada	37,5	0,0	50,0	20,0	
	Grave	12,5	44,4	0,0	20,0	
Esteatonecrose	Ausente	12,5	22,2	25,0	10,0	0,99
	Leve	37,5	33,3	25,0	40,0	
	Moderada	12,5	22,2	25,0	30,0	
	Grave	37,5	22,2	25,0	20,0	
Hemorragia	Ausente	87,5	22,2	37,5	30,0	0,04
	Leve	12,5	22,2	50,0	60,0	
	Moderada	0,0	44,4	12,5	10,0	
	Grave	0,0	11,1	0,0	0,0	
Infiltrado leucocitário	Ausente	87,5	22,2	37,5	30,0	0,23
	Leve	12,5	22,2	50,0	60,0	
	Moderada	0,0	44,4	12,5	10,0	
	Grave	0,0	11,1	0,0	0,0	

Após a análise entre os quatro grupos, dividindo-se todos os grupos de animais em apenas dois grupos, sendo eles, grupo sem suplementação de BP – A (grupo 2) e grupo com suplementação com BP – B (grupos 3, 4 e 5), continuou-se a observar maior ocorrência de hemorragia pancreática no grupo suplementado com BP ($p=0,03$). (Tabela 4)

Tabela 4. Percentual da ocorrência de hemorragia pancreática nos grupos de animais sem suplementação – A (grupo 2) e com suplementação de bactérias probióticas – B (grupos 3, 4 e 5), de acordo com análise microscópica.

Avaliação histopatológica	Gravidade	Grupos de animais		Teste exato de Fisher (p)
		A	B	
Hemorragia pancreática	Ausente	87,5	29,6	0,03
	Leve	12,5	44,4	
	Moderada	0	22,2	
	Grave	0	3,7	

6.5 – CULTURA DE MICRORGANISMOS

Não foi detectada contaminação no líquido peritoneal e nos órgãos intra-abdominais analisados (baço, fígado, linfonodo ileal e pâncreas) nos animais do grupo 1 (operação simulada).

Analisando-se a proporção de culturas positivas para microorganismos aeróbicos nos grupos com indução de PA, observou-se que todos os animais do grupo 3 (suplementação de BP antes da indução de PA) e do grupo 4 (suplementação de BP após a indução de PA) apresentaram culturas positivas para microorganismos aeróbicos.

Houve um número maior de culturas positivas para microorganismos aeróbicos nos animais dos grupos que receberam suplementação com BP em apenas um momento (antes ou depois da indução de PA), quando comparado com o grupo de animais que não recebeu suplementação (grupo 2) ou que recebeu suplementação antes e após a indução de PA (grupo 5). A proporção de animais com cultura positiva para microorganismos, em relação ao número de animais em cada grupo de estudo, encontra-se indicado na tabela 5.

Tabela 5. Proporção de culturas positivas para microorganismos aeróbicos em relação ao número de animais, em cada grupo de estudo.

Grupos de animais	Número de culturas positivas / número total de animais
1	0 / 8
2	7 / 8
3	9 / 9
4	8 / 8
5	9 / 10

No que se refere à proporção de tecidos com culturas positivas para microorganismos aeróbicos, observou-se um maior comprometimento nos animais do grupo 3, que receberam suplementação com BP antes da indução de PA (tabela 6). Nos animais do grupo 2, os órgãos com maior ocorrência de colonização bacteriana foram fígado e pâncreas, enquanto que nos animais do grupo e, a colonização ocorreu em fígado, linfonodo e pâncreas; nos animais do grupo 4, os órgãos mais acometidos foram fígado e linfonodo e nos animais do grupo 5, fígado, linfonodo e pâncreas. (Tabela 6)

Tabela 6. Proporção de tecidos com culturas positivas para microrganismos aeróbicos, em relação ao número de animais, em cada grupo de estudo.

Grupos de animais	Número de culturas positivas / número total de animais				
	B	F	LN	LP	P
1	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9
2	3 / 8	5 / 8	3 / 8	3 / 8	4 / 8
3	5 / 9	7 / 9	8 / 9	4 / 9	8 / 9
4	3 / 8	5 / 8	7 / 8	1 / 8	4 / 8
5	1 / 10	7 / 10	7 / 10	2 / 10	7 / 10

B – baço; F – fígado; LN – linfonodo ileal; LP – líquido peritoneal; P – pâncreas.

Com a avaliação microbiológica, foram isolados cinco tipos de bactérias aeróbicas potencialmente patogênicas: *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), como mostrado na tabela 7. Entretanto, a bactéria *P. aeruginosa* foi isolada em apenas um animal do grupo 3, diferindo das demais. Nos animais do grupo 4, somente foram encontradas bactérias gram-negativas (*Proteus sp*, *Klebsiella sp*. e *E. coli*), enquanto nos animais dos grupos 2, 3 e 5 foram encontradas bactérias gram-negativas (*Proteus sp*, *Klebsiella sp.*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) e gram-positivas (*S. aureus*).

A tabela 7 demonstra a análise descritiva da colonização bacteriana, identificando o tipo de bactéria e o local em que ela foi encontrada, em cada animal, de acordo com cada grupo de estudo. Pode-se observar que no grupo 2 somente um dos sete animais com culturas positivas apresentou colonização por mais de uma espécie de bactéria. Em contrapartida, no grupo 3, um dos grupos com maior ocorrência de colonização bacteriana, somente um dos nove animais com culturas positivas não apresentou colonização por mais de uma espécie de bactéria. No

grupo 4, dois dos oito animais com culturas positivas, e no grupo 5, cinco dos nove animais com culturas positivas, apresentaram colonização por mais de uma espécie bacteriana.

No que se refere à análise dos tecidos colonizados, observou-se que, no grupo 2, três dos sete animais com culturas positivas apresentaram colonização bacteriana em apenas um local; no grupo 3, além de se encontrar maior ocorrência de colonização por mais de uma espécie de bactéria, todos os nove animais com culturas positivas apresentaram colonização em mais de um local; no grupo 4, um dos oito animais com culturas positivas apresentou colonização bacteriana em apenas um local; e, no grupo 5, três dos nove animais apresentaram colonização bacteriana restrita a um local. Como pode ser apreciado na tabela 7, observou-se maior ocorrência de colonização bacteriana por *Proteus* sp. e *E. coli*. em todos os grupos de animais do estudo.

Apesar de se observar maior número de animais com contaminação bacteriana nos grupos com suplementação de BP, notadamente no grupo 3, não ocorreu diferença significativa no que concerne à colonização bacteriana em cada órgão estudado, entre os quatro grupos, como mostrado na tabela 8.

Tabela 7. Colonização bacteriana observada nos animais dos grupos submetidos a indução de pancreatite aguda.

Grupos de animais	Órgão	<i>Proteus</i>	<i>S.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>P.</i>
		sp.	<i>aureus</i>		sp.	<i>aeruginosa</i>
Animais						
2	B	---	7	6 e 8	---	---
	F	4 e 5	---	3,6 e 8	---	---
	LN	2 e 5	---	8	---	---
	LP	5	---	8	3	---
	P	3 e 5	---	6 e 8	---	---
3	B	6 e 7	---	3,6,8 e 9	----	1
	F	2,4,6 e 7	9	3 e 8	---	---
	LN	---	---	3,4,5,7,8 e 9	6	---
	LP	6	---	3,6 e 8	2	---
	P	2,5,6,7 e 8	---	1,3,8 e 9	---	---
4	B	1	---	2	3	---
	F	1 e 4	---	2, 6 e 8	---	---
	LN	1	---	2,4,5,6,7 e 8	---	---
	LP	1	---	---	---	---
	P	3 e 4	---	2 e 7	---	---
5	B	---	---	4	---	---
	F	6,7 e 9	8	2,3 e 4	---	---
	LN	---	---	2,4,6,7,9 e 10	8	---
	LP	2	---	4	---	---
	P	6 e 7	2	4,5,8 e 9	---	---

B – baço; F – fígado; LN – linfonodo ileal; LP – líquido peritoneal; P – pâncreas.

Tab. 8. Percentual de contaminação dos órgãos por grupo de animais submetidos a indução de pancreatite aguda.

Órgão	Grupos de animais				Teste exato de Fisher (p)
	2	3	4	5	
Baço	37,5	55,6	37,5	10,0	0,20
Fígado	62,5	77,8	62,5	70,0	0,89
Linfonodo ileal	37,5	88,9	87,5	70,0	0,10
Líquido peritoneal	37,5	44,4	12,5	20,0	0,46
Pâncreas	50,0	88,9	50,0	70,0	0,27

Quando se os animais foram dicotomizados em apenas dois grupos, um grupo que não recebeu suplementação de BP e outro grupo que recebeu suplementação de BP, observou-se uma quantidade maior e significativa de animais com contaminação no linfonodo ileal no grupo que recebeu a suplementação ($p=0,02$). Entretanto, para os demais órgãos, não se observou diferença.

7 – DISCUSSÃO

A descrição patológica da pancreatite aguda (PA), da necrose e do abscesso pancreático foi apresentada por Ancelet, em 1856 (*apud* Carneiro & Batista, 2004),⁴⁹ e, em 1889, Reginald Fitz descreveu relatos clínicos e patológicos das várias formas de PA. (*apud* Learch *et al*, 1990; Chavez-Rossel, 2002)^{50,51} Desde então, numerosos estudos clínicos e patológicos vêm sendo realizados para o conhecimento acerca da fisiopatologia, diagnóstico, classificação e de possíveis ações terapêuticas na PA.⁴⁹

Apesar de inúmeros avanços, a PA ainda se constitui em um verdadeiro desafio para os profissionais da área de saúde e muitas interrogações persistem, principalmente sobre a sua fisiopatologia, haja vista que há desencadeamento de processos pouco esclarecidos que convergem para um mecanismo central, independentemente da etiologia, caracterizados pela ativação das enzimas pancreáticas, com conseqüente autodigestão tissular e inflamação local, podendo, ainda, deflagrar em processo inflamatório sistêmico e disfunção múltipla de órgãos.^{9,49,52}

Diante das implicações clínicas e do grande potencial de morbidade da PA, notadamente pelas complicações infecciosas, provavelmente decorrente da TB⁸, métodos para profilaxia de infecção vêm sendo propostos, pois pouco se avançou no que tange a este aspecto. Entretanto, acredita-se que a ocorrência dessas complicações possa ser minimizada com o controle da TB oriunda do lúmen intestinal, por meio da utilização de bactérias probióticas.⁴⁵

O exato momento para instituição de uma possível medida profilática para evitar as complicações infecciosas é objeto de debate. Bengmark (2004), após realização de estudo experimental com indução de PA, relatou a existência de um intervalo terapêutico não maior que 24-36 horas para início de eventual tratamento.

Foi enfatizado, ainda, que melhores resultados podem ser obtidos caso o tratamento seja instituído antes desse momento, ou o mais precocemente possível do início do processo agudo da doença, uma vez que a flora bacteriana benéfica é totalmente destruída após 6-8 horas do início da PA.⁵³ Fundamentado na consideração que a utilização das bactérias probióticas poderia, eventualmente, evitar a infecção da necrose pancreática, procedeu-se à sua suplementação dietética, antes e/ou imediatamente após a indução da PA em ratos.

Na atualidade, a utilização de BP se constitui no método dietético mais utilizado para a modificação da flora intestinal, conferindo efeitos benéficos ao hospedeiro, dentre eles a redução e a eliminação de microorganismos potencialmente patogênicos e de toxinas, e a modulação dos mecanismos da defesa imune inata e adaptativa.^{22,53,54}

As principais espécies de bactérias com propriedades probióticas são os lactobacilos e as bifidobactérias,⁵⁵ que podem estar presentes tanto nos alimentos (leites fermentados) como em suplementos alimentares ou em medicamentos.^{35,56} As doses, as cepas de bactérias utilizadas e o tempo ideal para sua suplementação têm sido motivo de diversos estudos, com o emprego de diferentes dosagens, combinações de cepas e o momento ideal para o início da suplementação, dificultando, sobremaneira, a padronização e comparação dos resultados, tanto em estudos experimentais como em humanos.^{34,45,57,58}

Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Em um projeto anterior, utilizou-se uma combinação de cepas probióticas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*) na dose diária de $1,2 \times 10^9$ UFC,

suplementada durante 14 dias antes da indução da PA. Nesse trabalho, foi observado que a suplementação dietética com essas cepas de BP, na concentração utilizada, pareceu não influenciar a ocorrência de TB na pancreatite aguda induzida, apesar de promover alterações menos intensas em alguns dos parâmetros bioquímicos avaliados,⁵⁹ o que pode se dever à utilização de uma concentração insatisfatória de bactérias probióticas.

Como inexistente um consenso sobre o assunto, neste estudo optou-se pela suplementação de bactérias probióticas com uma dosagem de 4×10^9 UFC por dia, em concordância com o que vem sendo utilizado por diversos autores.^{44,45,57} Acredita-se que doses mais elevadas de BP não devam ser empregadas, haja vista a possibilidade de efeitos colaterais, pois, apesar dos produtos utilizados na suplementação de BP serem considerados seguros, podem surgir complicações, como infecção, estimulação imunológica excessiva e transferência de genes para a flora endógena, notadamente em indivíduos imunocomprometidos.⁵⁶

A ocorrência de infecções por lactobacilos é rara, porém vem sendo identificada há algum tempo e possui um significado clínico importante.^{60,61} Casos de endocardite infecciosa, bacteremia, pneumonia, abscesso esplênicos e hepáticos por lactobacilos, como *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. leichmanii*, vêm sendo identificados,⁶¹⁻⁶⁴ especialmente em pacientes imunocomprometidos submetidos a procedimentos cirúrgicos de grande porte e a tratamento prolongado com antibióticos.⁶⁵ Também existe relato de translocação de *Lactobacillus paracasei* em um paciente imunocomprometido com PA, com conseqüente infecção da necrose pancreática.⁶⁶

Optou-se pela mistura de multicepas de bactérias probióticas, pois a maioria dos estudos realizados anteriormente apresentou limitações, devido à utilização de

apenas um tipo de cepa de bactéria probiótica.^{34,43,44} Sendo os efeitos exercidos cepa-específicos, acredita-se que não exista uma única cepa que possua todas as propriedades desejadas e que seja capaz de inibir todos os patógenos.^{67,68} Adicionalmente, as multicepas utilizadas são de origem humana, estão presentes na forma de células vivas e em grande quantidade, são resistentes aos sucos gástrico e biliar e possuem habilidade para aderir e colonizar os enterócitos, requisitos necessários para serem consideradas bactérias probióticas e desempenharem efeitos benéficos no hospedeiro.^{26,69}

Na combinação e utilização de cepas probióticas, o espectro antimicrobiano pode ser aumentado, além de elevar a produção de IL-10 e diminuir a concentração de citocinas pró-inflamatórias.⁶⁸ Em estudo *in vitro*, algumas cepas probióticas, como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *B. bifidum* e *B. infantis*, foram capazes de inibir o crescimento de patógenos comumente encontrados na infecção da necrose pancreática, como *Klebsiella*, *E. coli* e *P.aeruginosa*, entre outras.⁶⁸ Aliado a estes fatores, Bernet & Brassart (1994) apontam a habilidade da bactéria *L. acidophilus* em inibir a aderência de bactérias patogênicas, como *E. coli* e *Salmonella typhimurium*.⁷⁰ Já Makras *et al* (2006) detectaram que a utilização de *Bifidobacterium longum* mostrou-se capaz de inibir o crescimento de *E. coli*.⁷¹

A indução experimental de PA pela inoculação do taurocolato de sódio a 5% no ducto biliopancreático foi descrita primeiramente por Heinkel, em 1953. (*apud* Lange *et al*, 1986)⁷² Desde então, este modelo está bem estabelecido e vem sendo largamente utilizado, apresentando alto grau de reprodutibilidade.^{21,72-74} O taurocolato de sódio é um ácido biliar com ação detergente que, ao ser inoculado no ducto biliopancreático, ocasiona dano vascular, necrose acinar e processo inflamatório pancreático.^{73,74} Entretanto, a gravidade da PA induzida pelo taurocolato

de sódio depende da concentração utilizada, sendo que as concentrações mais habitualmente empregadas são 3% e 5%, acarretando PA moderada ou grave, respectivamente.^{21,73,74}

Além deste método de indução, outros são descritos na literatura, sendo classificados como invasivos e não-invasivos, pela necessidade ou não de procedimento cirúrgico.⁷⁵ Contudo, esta classificação não engloba a causa da PA, nem a sua gravidade. Dentre os métodos de indução de PA utilizados por diversos autores, citam-se: inoculação intraperitoneal de solução contendo o aminoácido L-arginina,⁷⁶ utilização de dieta deficiente em colina e suplementada com metionina,^{75,77} infusão venosa de altas doses de secretagogo, como a ceruleína, superestimulando a secreção pancreática,^{75,77-79} utilização de anticolinesterásicos,^{75,77-79} confecção de alça duodenal fechada, ocasionando refluxo das secreções intestinal, pancreática e biliar; e ligadura do ducto pancreático ou biliar, provocando o refluxo biliar e da secreção pancreática.^{75,77-79}

Optou-se pela utilização do taurocolato de sódio, por ser um método de fácil execução, pouco dispendioso e compatível com o desenvolvimento de um quadro de PA grave, além de ser considerado um modelo adequado para avaliar a TB e possíveis ações profiláticas, uma vez que a ocorrência da infecção pancreática e de outros órgãos ocorre freqüentemente e precocemente após a sua utilização.²¹ A pressão de inoculação do taurocolato de sódio no ducto biliopancreático, por si, pode levar a alterações na gravidade da lesão induzida.⁸⁰ No intuito de se minimizar essa possibilidade, criou-se uma câmara gasosa no interior da seringa, diminuindo-se e mantendo-se constante a pressão de infusão do ácido biliar.

Durante todo o experimento, os animais, independentes do grupo de estudo, apresentaram peso corporal médio, assim como valores médios de ingestão de água

e ração similares, demonstrando a homogeneidade dos animais dos diversos grupos.

Todos os animais foram submetidos a coletas sanguíneas e de material para análise microbiológica em um intervalo de 48 horas. Optou-se por esse intervalo, pois os níveis séricos de amilase apresentam maior elevação entre 12 e 24 horas após a indução da PA em ratos.⁸¹ Já em humanos, os picos de lipasemia e amilasemia costumam ocorrer 24 e 48 horas após a indução de PA, respectivamente.^{82,83} Ademais, pareceu-nos adequado o intervalo de tempo de 48 horas após a indução da PA para a coleta do material para análise microbiológica, haja vista que, de acordo com a literatura, as infecções pancreáticas e extra-intestinais parecem acontecer no período compreendido entre 8 e 32 horas após a indução, permitindo, assim, a avaliação do efeito da suplementação com BP na TB.²¹

Na PA em humanos, o diagnóstico de PA deve ser considerado quando os níveis séricos das enzimas pancreáticas (lipase e amilase) aumentam três vezes ou mais o limite superior de referência, em associação ao quadro clínico do paciente,⁸³⁻⁸⁵ acreditando-se que a determinação simultânea desses dois marcadores aumenta a sensibilidade do diagnóstico da doença.⁸⁶

Excetuando-se o grupo de animais submetidos a operação simulada (grupo 1), que manteve níveis séricos de amilase e lipase similares em todos os momentos, os demais grupos (com indução de PA) apresentaram aumento importante dos níveis das enzimas pancreáticas. Comparando-se os grupos com PA com o grupo controle, observou-se elevação significativa da amilase sérica na 24^a hora, em torno de oito vezes o valor médio encontrado na hora 0, ratificando o achado de outros autores.⁸¹ Em relação à lipasemia, observou-se um delineamento similar à

amilasemia, com aumento entre 11 e 29 vezes dos seus níveis na hora 24, em todos os grupos de animais submetidos a indução de PA, em comparação ao valor encontrado na hora 0, compatível com um quadro de agressão aguda ao pâncreas.^{81,82,87}

O aumento dos níveis séricos de glicose e do número de leucócitos, e a diminuição dos níveis séricos de cálcio estão associados a um mau prognóstico na PA.^{82,85,88} O aumento da glicemia pode residir na perda progressiva de função das células das ilhotas de Langerhans, sugerindo complicação da doença e aumento da sua morbimortalidade.⁸⁸ No tocante ao número de leucócitos, a ocorrência de leucocitose, além de estar possivelmente correlacionada com a piora da gravidade da PA, é um dos responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas TNF- α ,⁴⁹ cuja presença pode ser considerada como uma das principais causas para o desenvolvimento de sepse e falência de múltiplos órgãos.⁵² A diminuição da calcemia se deve à progressão do processo inflamatório e pelo extravasamento do líquido intravascular rico em albumina para a cavidade abdominal.⁸² Como o cálcio é transportado ligado à albumina, seus níveis séricos tendem a reduzir, à medida que este extravasamento aumenta.⁸²

Nossos resultados sugerem que a suplementação com multicepas probióticas não influenciou a evolução da glicemia, dos níveis séricos de cálcio e da contagem leucocitária nos diversos grupos de animais. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os animais submetidos a indução de PA, observou-se diminuição dos níveis séricos de cálcio em todos os grupos na hora 24, sendo esta redução maior nos grupos com suplementação com bactérias probióticas. Outro fato peculiar observado, porém também sem diferença significativa, foi a diminuição da contagem leucocitária nos grupos 2 (sem suplementação com bactérias probióticas) e 5 (com

suplementação com bactérias probióticas antes e após a indução da PA) na hora 24, diferindo dos demais, que apresentaram elevação em seus valores.

Na avaliação morfológica pancreática, as alterações encontradas ocorreram em áreas relativamente extensas, mas, mesmo com o passar do tempo, não abrangeram todo o órgão, corroborando dados da literatura.⁷³ Nossos resultados ratificam as descrições de Aho *et al* (1980) e, mesmo após 48 horas da indução, observou-se somente áreas focais de lesão, com danos das células acinares, esteatonecrose, infiltrado leucocitário, caracterizando grave dano ao pâncreas.⁷³ Observou-se maior ocorrência de áreas hemorrágicas nos grupos de animais submetidos a suplementação de BP, independentemente do momento em que ocorreu a suplementação, em comparação ao grupo controle (sem suplementação). Os demais parâmetros analisados (esteatonecrose, infiltrado leucocitário e proteólise) foram similares entre todos os grupos de animais submetidos a indução de PA.

Muftuoglu *et al* (2005)⁵⁷ observaram que a gravidade da PA em grupo de animais com suplementação de BP foi menos intensa quando comparado com um grupo controle, em contraposição a Van Minnem *et al* (2007)⁴⁵ que, em experimento análogo, encontraram resultados similares entre os grupos de estudo. Para a avaliação e classificação da gravidade da doença, esses dois grupos de pesquisadores também utilizaram a análise histopatológica, levando em consideração os parâmetros fibrose, lise acinar, edema, necrose pancreática, infiltrado de células mononucleares, infiltrado leucocitário e dano ductal.

A infecção pancreática e de tecidos extra-intestinais é um achado freqüente na PA induzida pelo taurocolato de sódio,²¹ o que pode ser confirmado pelas observações do nosso estudo, 48 horas após sua indução. As bactérias gram-

negativas são as mais freqüentemente encontradas na necrose pancreática, o que sugere que o cólon e o íleo terminal sejam as principais fontes de bactérias contaminantes.²¹ A contaminação dos tecidos extra-intestinais, considerados tecidos estéreis, sustenta a hipótese que a TB seja conseqüência da disfunção da barreira intestinal.¹⁴

A mucosa intestinal é uma barreira efetiva contra a passagem de bactérias e toxinas presentes no lúmen intestinal. Na PA, a presença da hipovolemia e a conseqüente hipoperfusão esplâncnica, constituem-se em causas importantes para o aumento da permeabilidade intestinal.⁸⁹ Este aumento é caracterizado pela mudança das junções intercelulares intestinais,⁹⁰ sendo considerado um dos principais fatores contribuintes para disfunção da barreira intestinal e a provável explicação para ocorrência da TB para tecidos locais e órgãos distantes.^{11,91}

Aliado ao aumento da permeabilidade intestinal e à sua relação com a ocorrência da infecção pancreática,¹⁶ outros fatores presentes durante a PA podem contribuir para a TB, como a ruptura da microflora bacteriana indígena do intestino, a diminuição das defesas imunes do hospedeiro,⁹² e a diminuição da velocidade do trânsito intestinal, provavelmente pela ruptura do complexo migratório mioelétrico, favorecendo o supercrescimento de certas bactérias no lúmen intestinal, principalmente gram-negativas.⁹³⁻⁹⁵

Os microorganismos detectados nos tecidos e culturas sanguíneas nos pacientes com PA são, habitualmente, *E. coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Cândida*, sendo a *Enterobacteriaceae* e a *E. coli* as bactérias mais encontradas.^{96,97} Porém, o tipo de bactéria encontrada na PA parece estar associado à sua etiologia, pois as gram-

negativas são mais freqüentes na pancreatite biliar, enquanto que as gram-positivas o são na pancreatite alcoólica.⁹⁸

Em diversos estudos experimentais com indução de PA tem sido demonstrado que o espectro da infecção bacteriana pancreática reflete o mesmo tipo de bactérias presente no intestino, como *E. coli*, *Proteus*, *Enterococcus* e *Staphilococcus*.^{21,45} Entretanto, as bactérias gram-negativas, principalmente a *E. coli*, são as mais encontradas, tanto no pâncreas como em outros órgãos.^{20,21,45}

Nossos achados apresentam similaridade com o padrão da contaminação da necrose pancreática encontrada tanto em humanos^{96,97} quanto em estudos experimentais.^{20,21,45} À análise microbiológica, não foram identificadas outras bactérias, além das pertencentes à flora normal, no tecido pancreático e nos outros tecidos extra-intestinais. O espectro de bactérias isoladas se consistiu de bactérias gram-negativas, como *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e gram-positiva (*S. aureus*).

Apesar da análise estatística realizada entre os quatro grupos de animais submetidos a indução de PA (grupos 2, 3, 4 e 5) não ter evidenciado diferença no percentual de contaminação dos órgãos, torna-se importante ressaltar que se observou maior contaminação nos animais dos grupos com suplementação de bactérias probióticas, principalmente no grupo 3, em que também se observou maior número de culturas positivas, de proporção de tecidos colonizados e de colonização por mais de uma espécie bacteriana. Todavia, nos animais dos grupos 2, 3 e 4 observou-se a presença tanto de bactérias gram-negativas como gram-positivas, enquanto no grupo 4 apenas foram detectadas bactérias gram-negativas.

Em contraposição, na análise realizada entre o grupo que não recebeu suplementação com BP (grupo 2) e os grupos que receberam tal suplementação

(grupos 3, 4 e 5), observou-se significativa contaminação do linfonodo ileal nestes últimos. Estudos experimentais demonstraram que as células epiteliais intestinais sob estresse metabólico reagem à presença de bactérias comensais, como uma ameaça, intensificando a resposta inflamatória.⁹⁹ Assim, uma hipótese para a maior ocorrência de TB no grupo com BP seria o aumento da resposta inflamatória, decorrente da presença do grande número de bactérias, ocasionando redução da perfusão sanguínea intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, maior índice de TB. Este resultado se contrapõe aos achados de Magiante *et al* (2001),⁴⁴ e de Van Minnen *et al* (2007),⁴⁵ que demonstraram menor incidência de TB para os linfonodos mesentéricos nos grupo de animais suplementados com *L. plantarum* e com multicepas probióticas, respectivamente.

O desenvolvimento da TB depende do trauma e da virulência dos microorganismos da flora indígena, podendo, contudo, desenvolver-se a TB espontânea, que parece ocorrer continuamente em animais saudáveis, a uma taxa muito baixa, sendo o hospedeiro capaz de eliminar essas bactérias invasoras.⁹² No primeiro estágio de TB, as bactérias estão presentes nos linfonodos mesentéricos, mas não se propagam sistemicamente para outros órgãos; no segundo estágio, a bactéria se propaga do linfonodo para outros órgãos, tais como fígado, baço, pâncreas e rim; e o terceiro estágio é determinado quando a bactéria se propaga sistemicamente para a cavidade peritoneal e para a corrente sanguínea, podendo resultar em choque séptico.⁹²

Essas observações corroboram os achados da análise microbiológica dos tecidos coletados no nosso estudo, pois um dos órgãos que apresentou maior percentual de culturas positivas, além do fígado e pâncreas, foi o linfonodo ileal (exceto no grupo 2, sem suplementação), o primeiro a ser contaminado.⁹² Os locais

com menores índices de colonização bacteriana foram o baço e o líquido peritoneal, sendo sua colonização decorrente da propagação da TB.

O mecanismo pelo qual advém a contaminação pancreática e de outros tecidos extra-intestinais não está totalmente elucidado. Em estudos experimentais, têm-se observado que as bactérias utilizam diferentes rotas para alcançar os órgãos extra-intestinais, como a passagem transmural através da parede intestinal,^{100,101} a transperitoneal pelos ductos linfáticos,^{18,101} a sanguínea^{100,101} e o líquido peritoneal.¹⁶ Nossos achados podem sugerir que as bactérias utilizaram preferencialmente a via linfática para atingir outros tecidos, justificado pelo maior acometimento do linfonodo ileal e subsequente contaminação do fígado e pâncreas.

Durante o estudo, observou-se que o padrão de colonização bacteriana não foi similar entre os grupos, com maior ocorrência de TB para o linfonodo nos grupos suplementados com BP. Já Mangiante *et al* (2001)⁴⁴ relataram sucesso na redução da TB no grupo suplementado; entretanto, somente utilizaram como parâmetros para avaliação da TB as culturas no sangue, pâncreas e o linfonodo mesentérico. Acredita-se que a maior diversidade de órgãos coletados e analisados permita maior dimensão e abrangência na avaliação da ocorrência da TB.

Complicações infecciosas, potencialmente oriundas da TB, constituem um importante preditor de mortalidade na PA.⁸ Diante dos resultados desanimadores do uso profilático de antibióticos para evitar as complicações infecciosas,^{22,34} a suplementação com bactérias probióticas tornou-se uma alternativa promissora.

Os primeiros estudos em que se avaliou o uso de probióticos e simbióticos na minimização de complicações infecciosas, colonização gástrica e TB foram realizados em pacientes em pré-operatório de operações eletivas, que, entretanto, falharam como alternativa promissora aos antibióticos.^{14,102} Um primeiro estudo, em

pacientes no período pré-operatório de cirurgia abdominal eletiva, recebendo três cápsulas por dia de cepas probióticas, na dose de 4×10^9 UFC, associado com oligofrutose (prebiótico), durante duas semanas,¹⁰² e outro, utilizando apenas uma cepa probiótica (*L. plantarum* 299v – diluído em 500 ml, à concentração de 5×10^7 UFC/ml), durante sete dias.¹⁴ Em ambos os casos, os autores não observaram melhora dos parâmetros avaliados, inclusive no que se refere à resposta inflamatória sistêmica e à morbidade.

Em estudos experimentais com indução de PA, o uso de probióticos com o intuito de se minimizar a ocorrência da TB, complicações infecciosas e em se constituir em alternativa ao uso dos antibióticos, os resultados foram animadores. Em um recente estudo, em ratos com indução de PA, realizou-se suplementação dietética com multicepas probióticas, na dose 5×10^9 UFC por dia, no período de cinco dias antes da indução e de seis dias após, verificando-se a redução tanto da TB como da morbimortalidade tardia nos animais suplementados.⁴⁵ Da mesma forma, como relatado anteriormente, Magiante et al (2001)⁴⁴ também verificaram redução da TB com a utilização de probióticos na PA experimental.

Também existem estudos em humanos com PA com resultados promissores, levando à redução das taxas de TB em grupo de pacientes com dieta enteral suplementada com probióticos (*L. plantarum* 299), na dose de 10^9 UFC, quando comparado com um grupo utilizando placebo.^{34,58} Entretanto, esses autores no estudo realizado em 2002 excluíram os pacientes com pancreatite de origem biliar e tinham número amostral pequeno.³⁴ Em outro estudo, também utilizando *L. plantarum* 299, na mesma dose (10^9 UFC), durante sete dias após a internação de pacientes com PA, Kecskes et al (2003)⁴³ sugeriram que esta suplementação pode

ser uma ferramenta efetiva na prevenção da sepse pancreática, na redução do número de procedimentos cirúrgicos necessários e no tempo de estadia hospitalar.

Em contraposição, também existem recomendações contrárias ao uso de BP em pacientes com PA.¹⁰³ Em um estudo recente, randomizado duplo-cego e placebo-controlado, em pacientes com PA recebendo suplementação de bactérias probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *Lactococcus lactis* e *B. bifidum*), nas primeiras 72 horas do início dos sintomas, na dose diária de 10^{10} UFC, não se demonstrou os seus efeitos benéficos na ocorrência de complicações infecciosas. As taxas dessas complicações foram maiores no grupo com suplementação de BP, porém sem diferença significativa. No entanto, a mortalidade no grupo com suplementação de BP foi cerca de duas vezes mais elevada que no grupo placebo, levando à sugestão de que a combinação de cepas probióticas utilizada não deva ser administrada rotineiramente em doentes com PA grave e que essas preparações com probióticos não sejam mais consideradas inofensivas.¹⁰³

Também Jain *et al* (2004)¹⁰⁴, em um estudo randomizado com 90 pacientes críticos utilizando BP na prevenção de complicações infecciosas, também observaram, embora não significativamente, um aumento no número de complicações infecciosas. O mesmo foi observado por Honeycutt *et al* (2007)¹⁰⁵, em estudo com 61 crianças em uma unidade de cuidados intensivos, que necessitaram descontinuar prematuramente a suplementação com BP, pelo aumento de complicações infecciosas, em comparação a um grupo placebo.

Nossos resultados ratificam achados em humanos que sugerem que não se deva realizar a suplementação de BP em pacientes com PA.¹⁰³ A suplementação de BP que utilizamos, em diferentes momentos da indução da PA, com multicepas probióticas, pode ter falhado em prevenir a TB intestinal por inúmeras razões: o

suplemento pode ter sido administrado por tempo insuficiente, a dose utilizada pode ter sido parca ou excessiva para a população em questão (ratos) ou a combinação das cepas utilizada na prevenção da TB pode não ter sido a mais adequada. Aliado a estes fatores, existe a hipótese de que a pancreatite induzida nos animais pode ter sido de uma gravidade tal que acarretasse desordens metabólicas muito intensas que impossibilitaram que as BP desempenhassem suas ações benéficas. Estudos adicionais são necessários, com diferentes doses e cepas de bactérias probióticas, em animais de diferentes linhagens e espécies, submetidos a indução de PA, para se determinar a inequívoca ação de bactérias probióticas na translocação bacteriana.

8 – CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que a suplementação dietética com *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. brevis* e *Streptococcus thermophilus*, antes e/ou depois da indução da PA em ratos:

- não modifica o perfil dos marcadores bioquímicos e da contagem leucocitária;
- não previne nem diminui a ocorrência de translocação bacteriana;
- aumenta a ocorrência e a intensidade da hemorragia pancreática.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cukier C, Magnoni CD, Campos ACL. Terapia nutricional em pancreatite aguda. In: Campos ACL, editor. Nutrição em Cirurgia. São Paulo: Atheneu, 2001; p. 141-50.
- 2- McKay CJ, Butter A. Natural history of organ failure in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2003; 3:111-4.
- 3- Algul H, Tando Y, Schneider G, Weidenbach H, Adler G, Schmid RM. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. *Pancreatology*. 2002; 2:503-9.
- 4- Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002; 1:343-51.
- 5- Malhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002; 9:401-10.
- 6- Norman, J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*. 1998; 175:76-83.
- 7- Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HC. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Pancreatology*. 2001; 1:63-8.
- 8- Buchler MW, Gloor B, Muller CA, Friess H, Seiler CA, Uhl W. Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg*, 2000; 232: 627-9.
- 9- Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, *et al*. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2005; 5:132-144.
- 10- Jenkins B, Holsten S, Bengmark S, Martindale R. Probiotic: a practical review of their role in specific clinical scenarios. *Nutr Clin Pract*. 2005; 20:262-70.

- 11- Berg, RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun.* 1979; 23:403-11.
- 12- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003; 361:512-9
- 13- Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch surg* 1990; 125:403-04.
- 14- McNaught CE, Woodcock NP, MacFie J, Mitchell CJ. A prospective randomized study of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299V on indices of gut barrier function in elective surgical patients. *Gut.* 2002; 51:827-31.
- 15- Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10:415-8.
- 16- Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, *et al.* Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil.* 2003; 15:267-76.
- 17- Nieuwenhuijs VB, Verheem A, Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, Akkermans LM. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg.*1998; 228:188-93.
- 18- Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M: Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology.* 1986; 91:433-8.
- 19- Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis:

- correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J. Gastrointest. Surg.* 1999; 3:252-62.
- 20- Wu CT, Li ZL, Xiong DX. Relationship between enteric microecologic dysbiosis and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 1998; 4:242-5.
- 21- Schwarz M, Thomsen J, Meyer H, Büchler MW, Berger HG. Frequency and time course of pancreatic and extrapancreatic bacterial infection in experimental acute pancreatitis in rats. *Surgery.* 2000; 127:427-32.
- 22- Besselink MG, Timmerman HM, van Minnen LP, Akkermans LM, and Gooszen HG. Prevention of infectious complications in surgical patients: potential role of probiotics. *Dig Surg.* 2005; 22:234-244.
- 23- Dervenis C. Enteral nutrition in severe acute pancreatitis: future development. *JOP.* 2004; 5:60-3.
- 24- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998; 41:85-101.
- 25- Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(suppl):444S-50S.
- 26- Isolauri E. Probiotic. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2004; 18:299-313.
- 27- Quera R, Quigley EMM, Madrid AN. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal. *Rev Med Chile.* 2005; 133: 1361-70.
- 28- Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. *Dig Dis Sci.* 1986; 31(9 Suppl):147S-62S.
- 29- Andersson R, Wang XD. Gut barrier dysfunction in experimental acute pancreatitis. *Ann Acad Med Singapore.* 1999; 28:141-6.

- 30- Mazaki T, Ishii Y, Takayama T. Meta-analysis of prophylactic antibiotic use in acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg*. 2006; 93:674-84.
- 31- Vries AC, Besselink MGH, Buskens E, Ridwan BU, Schipper M, van Erpecum HJ, Gooszen HG. Randomized Controlled Trials of Antibiotic Prophylaxis in Severe Acute Pancreatitis: Relationship between Methodological Quality and Outcome. *Pancreatology*. 2007; 7:531–538.
- 32- De waele JJ, Vogelaers D, Blot S, Colardyn F. Fungal infections in patients with severe acute pancreatitis and the use of prophylactic therapy. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:208-13.
- 33- De waele JJ, Vogelaers D, Hoste E, Blot S, Colardyn F. Emergence of antibiotic resistance in infected pancreatic necrosis. *Arch Surg*. 2004; 139:1371-5.
- 34- Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2002; 89:1103-7.
- 35- McNaught CE, MacFie J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutr Res*. 2001; 21:343-53.
- 36- Rolfe, RD. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*. 2000; 130(2S suppl):396S-402S.
- 37- Aboud-Assi S, O'Keefe SID. Nutrition in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2001; 32:203-9.
- 38- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology*. 1993; 105:1643-50.

- 39- Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, Perdigon G: Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:485-92.
- 40- Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; 28:405-40.
- 41- Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol.* 2006; 17:204-10.
- 42- Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286:613-26.
- 43- Kecskes G, Belagyi T, Olah A. Early jejunal nutrition with combined pre- and probiotics in acute pancreatitis--prospective, randomized, double-blind investigations. *Magy Seb.* 2003; 56:3-8.
- 44- Mangiante G, Collucci G, Canepari P, Bassi C, Nicoli N, Casaril A, et al. *Lactobacillus plantarum* reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. *Dig Surg.* 2001; 18:47-50.
- 45- Van Minnen LP, Timmerman HM, Lutgendorff F, Verheem A, Harmsen W, Konstantinov SR *et al.* Modification of intestinal flora with multispecies probiotics reduces bacterial translocation and improves clinical course in a rat model of acute pancreatitis. *Surgery* 2007; 141:470-80.
- 46- Suassuna I, Suassuna IR. Duplo açúcar uréia (DAU). Um meio de triagem para enterobactérias. Nota técnica. *Rev Bras Patol Clin.* 1978;14:201-3.
- 47- Marques RG, Miranda ML, Caetano CER, Biondo-Simões MLP. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cir Bras.* 2005; 28:262-7.

- 48- Petroianu A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir Bras* 1996; 11:157-64.
- 49- Carneiro MC, Batista, RS. O mosaico patogênico da pancreatite aguda grave. *Rev Col Bras. Cir.* 2004; 31:391-7.
- 50- Leach SD, Gorelick FS, Modlin IM. Acute pancreatitis at its centenary. The contribution of Reginald Fitz. *Ann Surg.* 1990; 212:109-13.
- 51- Chavez-Rossell M. History of the pancreas and the evolution of concepts and classification of pancreatitis. *Rev Gastroenterol Peru.* 2002; 22:243-7.
- 52- Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut.* 2000; 47:546-52.
- 53- Bengmark S. Synbiotics to strengthen gut barrier function and reduce morbidity in critically ill patients. *Clin Nutr.* 2004; 23:441-5.
- 54- Bengmark S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17:833-48.
- 55- Montrose DC. and Floch, M.H. Probiotics used in human studies. *J Clin Gastroenterol.* 2005; 39:469-48.
- 56- Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17:725-40.
- 57- Muftuoglu MAT, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr.* 2006; 60:464-8.
- 58- Olah A, Belagyi T, Poto L, Romics L. Jr, Bengmark, S. Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study. *Hepatogastroenterology.* 2007; 54, 590-4.

- 59- Horst NL. Suplementação dietética com probióticos na resposta a pancreatite aguda grave em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2006.
- 60- Coelho de Souza DF, Ferreira CL, Coelho de Souza AV, Brunoro Costa NM, Ybarra LM, Azevedo EM. Translocação de *Lactobacillus acidophilus* em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico suplementada com probiótico. Cienc Tecnol Aliment. 2004; 24:522-6.
- 61- Yagi S, Akaike M, Fujimura M, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y et al. Infective endocarditis caused by *Lactobacillus*. Inter Med. 2008; 47:1113-6.
- 62- Gluck U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). Am J Clin Nutr. 2003; 77: 517-20.
- 63- Unoki T, Nakamura I, Fujisawa T, Mitsuoka T. Infective endocarditis due to *Lactobacillus acidophilus* group. Report of a case and review of the literature. Kansenshogaku Zasshi 1988; 62:835-40.
- 64- Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24:31-40.
- 65- Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V et al. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patients outcome, with special focus on probiotic *L. Rhamnosus* GG. Clinical Infection Disease. 2004; 38:62-9.
- 66- Z'Graggen WJ, Fankhauser H, Lammer F, Bregenzer T, Conen D. Pancreatic necrosis infection due to *Lactobacillus paracasei* in an immunocompetent patient. Pancreatology. 2005; 5:108-9.

- 67- Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96:219-33.
- 68- Ridwan BU, Koning CJM, Besselink MGH, Timmerman HM, Brouwer EC, Verhoef J et al. Antimicrobial activity of a multispecies probiotic (Ecologic 641) against pathogens isolated from infected pancreatic necrosis. *Letters in Applied Microbiology.* 2008; 46:61-7.
- 69- Fernandez MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 2003; 94:449-55.
- 70- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 1994; 35:483-9.
- 71- Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou, et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enteric* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol.* 2006; 157:241-7.
- 72- Lange JF, van Gool J, Tytgat GNJ. Experimental pancreatitis in the rat: role of bile reflux in sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Eur. surg. Res.* 1986; 18:369-74.
- 73- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1980; 15:411-6.
- 74- Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. *Scand J Gastroenterol.* 1980; 15:417-24.

- 75- Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? *Int J Colorectal Dis.* 2000; 15:127-35.
- 76- Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, et al. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci.* 1990; 35:367-74.
- 77- Steer ML. Workshop on experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 1985; 30:575-81.
- 78- Lerch MM, Adler G. Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol.* 1994; 15:159-70.
- 79- Hue Su K, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB.* 2006; 8:264-86.
- 80- Arendt T. Bile-induced acute pancreatitis in cats. Roles of bile, bacteria, and pancreatic duct pressure. *Dig Dis Sci* 1993; 38:39-44.
- 81- Ramos O, Leitão OR, Repka JCD, Barros SGS. Pancreatite aguda experimental induzida pela L-arginina: avaliação histológica e bioquímica. *Arq.Gastroenterol.* 2005; 42:55-9.
- 82- Smotkin J, Tenner S. Laboratory diagnostic tests in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2002; 34:459-62.
- 83- UK guidelines for the management of acute pancreatitis. Working Party of the British Society of Gastroenterology, Association of Surgeons of Great Britain and Ireland, Pancreatic Society of Great Britain and Ireland, Association of Upper GI Surgeons of Great Britain and Ireland. *Gut.* 2005;54 (Suppl. III):iii1-9.
- 84- Gumaste VV, Roditis N, Mehta D, Dave PB. Serum lipase levels in nonpancreatic abdominal pain versus acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:2051-5.

- 85- Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, et al. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17(Suppl):S15-S39.
- 86- Pacheco RC, Nishioka SA, Oliveira LC. Validade da amilase e da lipase no diagnóstico diferencial entre pancreatite aguda/crônica agudizada e outras causas de dor abdominal aguda. *Arq Gastroenterol.* 2003; 40:233-8.
- 87- Manes G, Kahl S, Schulz HU, Lippert H, Ferrara EC, Malfertheiner P. Early bacterial infection of the pancreas and course of disease in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Liver Dis.* 2006; 38:423-8.
- 88- Mentula P, Kylänpää ML, Kempainen E, Puolakkainen P. Obesity correlates with early hyperglycemia in patients with acute pancreatitis who developed organ failure. *Pancreas.* 2008; 36:21-5.
- 89- Juvonen PO, Tenhunen JJ, Heino AA, Merasto M, Paajanen HE, Alhava EM, Takala JA. Splanchnic tissue perfusion in acute experimental pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1999; 34:308-14.
- 90- Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzaki M, Sawa H, Nakajima T *et al.* Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res.* 2006; 135:18-26.
- 91- Papa M, Halperin Z, Rubinstein E, Orenstein A, Gafin S, Adar R. The effect of ischemia of the dog's colon on transmural migration of bacteria and endotoxin. *J Surg Res.* 1983; 35:264-9.
- 92- Berg RD. Translocation of enteric bacteria in health and disease. *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1992; 59:44-65.

- 93- Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, Larocco MT, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res.* 1991; 51:18-23.
- 94- Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, Chen Y, Larocco MT, Miller TA. Alterations in rat intestinal transit by morphine promote bacterial translocation. *Dig Dis Sci.* 1993; 38:1530-6.
- 95- van Santvoort HC, Besselink MG, Timmerman HM, van Minnen LP, Akkermans LM, Gooszen HG. Surgical research review. *Surgery.* 2008; 143:1-7.
- 96- Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21:130-5.
- 97- Mayerle, J, Simon P, Lerch MM. Medical treatment of acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am.* 2004; 33:855-69.
- 98- Rätty S, Sand J, Nordback I. Difference in microbes contaminating pancreatic necrosis in biliary and alcoholic pancreatitis. *Int J Pancreatol.* 1998; 24:187-91.
- 99- Nazli A, Yang PC, Jury J, Howe K, Watson JL, Soderholm JD *et al.* Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. *Am J Pathol.* 2004; 164:947-57.
- 100- Schmid SW, Uhl W, Friess H, Malfertheiner P, Büchler W. The role of infection in acute pancreatitis. *Gut.* 1999; 45:311-6.
- 101- Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KK. Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg.* 1993; 165:46-50.
- 102- Anderson AD, McNaught CE, Jain PK, MacFie J. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. *Gut.* 2004; 53:241-5.
- 103- Besselink MGH, Santvoort HCV, Buskens E, Boermeester MA, Goor HV, Timmerman HM, *et al.* Probiotic prophylaxis in predicted severe acute

- pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008; 371:651-9.
- 104- Jain PK, McNaught CE, Anderson AD, Macfie J, Mitchell CJ. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clin Nutr*. 2004; 23:467–75.
- 105- Honeycutt TC, El KM, Wardrop RM III, McNeal-Trice K, Honeycutt AL, Christy CG *et al*. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Crit Care Med*. 2007; 8:452-8.

ANEXO

Tabela A1. Peso inicial e final (em gramas) e percentual de variação ponderal de cada animal por grupo, durante o experimento.

Animal		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	I		268,53	244,95	257,62	267,02
	F	Óbito	275,60	239,75	220,18	250,26
	VP		2,56	-2,16	-17,0	-6,69
2	I	279,95	281,67	276,64	244,00	279,44
	F	279,92	255,61	244,99	226,67	279,09
	VP	-0,01	-10,19	-12,91	-7,64	-0,12
3	I	292,70	242,00	246,00	250,00	262,96
	F	280,15	245,45	237,52	243,52	251,9
	VP	-4,47	1,40	-3,57	-2,66	-4,39
4	I	259,57	252,00	259,88	280,00	251,17
	F	255,97	243,96	245,99	258,00	225,36
	VP	-1,40	-3,29	-5,64	-8,52	-11,45
5	I	260,00	266,85	268,28	266,69	266,28
	F	230,26	257,62	276,30	241,69	269,95
	VP	-12,91	-3,58	2,90	-10,34	1,35
6	I	240,89	263,59	275,36	260,94	269,36
	F	239,52	264,09	248,13	253,92	242,55
	VP	-0,57	0,18	-10,97	-2,76	-11,05
7	I		267,41	272,08	258,71	269,06
	F	Óbito	254,74	269,50	223,21	241,21
	VP		-4,97	-0,95	-15,90	-11,54
8	I	280,65	274,92	251,28	249,42	258,44
	F	265,11	264,48	228,47	231,01	229,40
	VP	-5,86	-3,94	-9,98	-7,96	-12,65
9	I	257,14		267,70		250,18
	F	240,82	Óbito	248,06	Óbito	238,13
	VP	-6,77		-7,91		-5,06
10	I	279,79				255,32
	F	269,51	Óbito	Óbito	Óbito	234,80
	VP	-3,81				-8,73
Média ± DP	I	268,83	264,62	262,46	258,42	262,92
	F	257,65	257,69	248,74	237,27	246,26

I – peso inicial; F – peso final; VP – variação ponderal

Tabela A2. Ingestão total de ração (em gramas) de cada animal, por grupo, entre os dias 01 e 07 do experimento.

Animal	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	Óbito	123,97	126,19	128,74	140,26
2	132,76	119,91	131,37	149,47	154,48
3	138,57	139,5	131,87	139	157,04
4	168,08	148,62	178,93	127,55	135,79
5	125,84	148,91	170,17	164,95	163,02
6	133,01	136,25	146,25	168,76	141,66
7	Óbito	168,43	144,76	126,05	136,77
8	127,45	137,56	148,21	126,54	117,05
9	146,91	Óbito	129,96	Óbito	152,95
10	133,36	Óbito	Óbito	Óbito	137,09
Consumo médio ± DP	138,97 ± 14,66	140,39 ± 15,31	145,30 ± 18,49	141,38 ± 17,66	143,61 ± 13,47

* - amostra sanguínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sanguínea.

DP – desvio padrão

Tabela A3. Ingestão total de água (em mililitros) de cada animal, por grupo, entre os dias 01 e 07 do experimento.

Animal	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	Óbito	249	249	282	278
2	320	295	313	316	282
3	327	323	295	308	319
4	317	320	348	267	292
5	272	320	315	348	310
6	330	360	251	369	280
7	Óbito	342	301	234	295
8	294	241	291	245	280
9	318	Óbito	340	Óbito	330
10	272	Óbito	Óbito	Óbito	335
Consumo médio ± DP	306,25 ± 26,70	306,25 ± 42,24	300,33 ± 34,29	296,12 ± 47,89	300,10 ± 21,81

* - amostra sanguínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sanguínea

DP – desvio padrão

Tabela A4. Valores da contagem leucocitária ($10^3/\text{mm}^3$), em cada momento de coleta sanguínea.

Animal / hora		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	0		8,4	8,6	6,1	10,1
	24	Óbito	11,0	9,9	4,0	*
	48		8,7	8,5	5,5	11,5
2	0	8,9	3,3	6,5	6,2	10,8
	24	9,3	2,3	3,2	6,7	6,9
	48	9,0	6,7	6,8	5,1	7,6
3	0	8,1	8,4	7,6	6,9	8,5
	24	*	4,9	9,6	6,9	12,7
	48	17,8	6,7	7,4	6,4	9,4
4	0	7,6	7,9	7,6	8,9	8,0
	24	12,6	7,8	11,2	7,6	9,5
	48	9,6	10,8	9,3	8,7	5,1
5	0	6,4	9,1	7,1	8,7	11,1
	24	10,3	8,9	*	12,1	*
	48	5,8	8,9	4,1	7,8	5,4
6	0	6,6	8,6	9,7	7,2	6,0
	24	14,6	9,7	13,9	5,8	8,3
	48	8,2	6,0	8,5	4,4	8,0
7	0		10,3	8,5	6,0	9,3
	24	Óbito	5,8	6,3	*	8,5
	48		6,0	3,8	5,1	6,2
8	0	9,7	10,4	8,1	6,9	4,8
	24	15,4	*	9,7	11,9	7,4
	48	12,0	1,5	12,0	9,6	25,3
9	0	8,8		8,2		11,8
	24	12,6	Óbito	12	Óbito	8,3
	48	7,0		11,9		7,5
10	0	6,6				9,7
	24	11,4	Óbito	Óbito	Óbito	5,8
	48	8,2				2,4
Média ± DP	0	7,83 ± 1,24	8,3 ± 2,21	7,98 ± 0,93	7,11 ± 1,12	9,01 ± 2,24
	24	12,31 ± 2,19	7,2 ± 3,03	9,47 ± 3,35	7,85 ± 3,04	8,42 ± 2,06
	48	9,7 ± 3,74	6,91 ± 2,75	8,03 ± 2,91	6,57 ± 1,91	8,84 ± 6,29

* - amostra sanguínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sanguínea.

DP – desvio padrão

Tabela A5. Valores da glicemia (mg/dl), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal / hora		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	0	---	198	173	210	124
	24	---	124	91	127	87
	48	---	127	106	152	135
2	0	176	125	214	165	208
	24	124	100	103	80	121
	48	148	208	122	105	90
3	0	128	175	186	213	183
	24	113	94	111	155	97
	48	145	99	151	136	238
4	0	148	206	152	189	139
	24	115	158	83	109	128
	48	148	396	151	212	176
5	0	124	160	181	186	198
	24	106	76	168	83	176
	48	229	141	187	236	196
6	0	143	238	171	218	140
	24	99	133	133	86	102
	48	420	146	173	150	169
7	0	---	247	187	163	123
	24	---	103	162	144	98
	48	---	105	111	108	80
8	0	178	197	208	144	271
	24	104	153	156	86	166
	48	209	93	144	121	158
9	0	194	---	153	---	146
	24	84	---	102	---	97
	48	257	---	211	---	206
10	0	201	---	---	---	187
	24	100	---	---	---	83
	48	279	---	---	---	49
Média ± DP	0	161,5±29,64	193,2±39,9	180,55±21,4	186 ± 26,9	171,9±46,6
	24	105,62±12,1	117,6±29,2	123,22±32,2	108,75±29,8	115,5±32,2
	48	229,37±92,8	164,3±100,5	150,67±35,1	152,5 ± 47,8	159,7±49,3

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sangüínea.

DP – desvio padrão

Tabela A6. Valores da amilase(mia (U/l), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal / hora		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	0	---	645	661	558	630
	24	---	2560	11070	3855	1159
	48	---	1955	1980	1382	719
2	0	616	561	707	504	513
	24	616	5960	5365	14211	3149
	48	683	1327	3388	2199	2325
3	0	662	450	519	568	651
	24	587	12458	3305	2133	1292
	48	701	15714	1204	760	687
4	0	569	517	617	477	430
	24	435	1101	4778	4371	671
	48	721	928	601	1794	379
5	0	400	502	471	645	296
	24	403	1846	4073	2272	1966
	48	725	1016	6151	1132	1424
6	0	475	741	561	664	371
	24	445	2526	1612	4439	3752
	48	660	2407	542	814	2060
7	0	---	682	548	429	391
	24	---	3538	5232	1899	2161
	48	---	2324	6366	611	464
8	0	533	574	419	392	271
	24	515	5044	2462	3436	589
	48	1037	1860	1532	983	511
9	0	531	---	418	---	529
	24	474	---	3199	---	590
	48	770	---	1171	---	515
10	0	467	---	---	---	478
	24	505	---	---	---	13452
	48	933	---	---	---	5713
Média ± DP	0	531,6±87,4	584±98,3	546,7±102,0	529,6±97,2	456 ±128,8
	24	497,5±74,2	4379,1±3641,4	4566,2±2745,1	4577±4020,5	2878,1±3870,2
	48	778,75±134,2	3441,3±4990,2	2548,3±2267,6	1209,3±550,9	1479,7±1642,9

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sangüínea.

DP – desvio padrão

Tabela A7. Valores da lipase(mia (UI/l), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal / hora		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	0	---	10	11	13	11
	24	---	235	680	120	30
	48	---	70	40	16	12
2	0	10	11	12	12	13
	24	11	113	170	1955	138
	48	9	15	97	57	61
3	0	11	12	11	12	17
	24	12	939	65	46	34
	48	8	488	14	16	69
4	0	12	11	21	13	6
	24	14	13	141	51	13
	48	10	15	62	27	5
5	0	12	14	5	15	5
	24	9	15	129	34	45
	48	13	5	147	85	11
6	0	11	20	2	17	5
	24	8	66	28	112	41
	48	12	94	*	66	23
7	0	---	17	4	5	6
	24	---	70	178	61	40
	48	---	108	112	*	10
8	0	18	10	7	6	6
	24	11	153	51	177	14
	48	12	7	19	18	11
9	0	15	---	7	---	*
	24	13	---	22	---	11
	48	13	---	19	---	6
10	0	16	---	---	---	7
	24	12	---	---	---	489
	48	12	---	---	---	119
Média ±	0	13,1± 2,8	13,1± 3,64	8,8±5,69	11,6±4,1	8,44 ± 4,24
DP	24	11,25 ± 1,98	202,8±305,7	162,67±202,9	319,5±662,5	85,5 ± 146,4
	48	11,1±1,8	101,5±161,1	63,7±49,8	40,7±28,2	32,7 ± 38,04

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sangüínea.

DP – desvio padrão

Tabela A8. Valores da calcemia (mg/dl), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal / hora		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	0	---	10,1	9,6	8,8	7,9
	24	---	9,9	9,1	8,5	7,7
	48	---	10,8	10,6	10,3	11,1
2	0	10,1	7,8	9,3	8	10
	24	10,2	8,3	7,9	8,1	10,6
	48	10	9,0	8,5	8,9	9,1
3	0	10,1	9,0	9,1	7,7	9,7
	24	9,5	8,4	8,1	8,2	9
	48	10,6	8,8	9,3	8,5	10,6
4	0	9,1	8,5	9,7	9,6	8,8
	24	7,9	9,0	7,9	9,9	9,6
	48	9,2	11,3	11,3	9,6	9,6
5	0	9,3	9,7	9,8	9,7	9,3
	24	8,7	10,8	10	9,3	10,7
	48	*	10,1	9,2	10,3	9,4
6	0	9,5	9,7	9,9	9,7	10,2
	24	8,4	8,2	9,9	8,7	8,6
	48	8,8	10,1	9,8	10,5	8,8
7	0	---	9,9	10,3	10,1	11,3
	24	---	9,2	10,4	10	8,6
	48	---	*	10,7	9,5	8,5
8	0	9,6	9,9	9,8	9,4	10,9
	24	10,2	9,9	9,7	8,5	8,8
	48	9,8	9,4	9,1	8,6	9,2
9	0	10,2	---	9,1	---	10,3
	24	10,3	---	8,8	---	8,4
	48	9,6	---	9,6	---	9,7
10	0	9,2	---	---	---	9,1
	24	10,7	---	---	---	8,7
	48	9,5	---	---	---	8,6
Média ±	0	9,64 ± 0,44	9,32±0,81	9,62±0,39	9,12 ± 0,87	9,75 ± 1,01
DP	24	9,49 ± 1,03	9,21± 0,93	9,09±0,97	8,90±0,74	9,07 ± 0,96
	48	9,64± 0,58	9,93±0,92	9,79 ± 0,90	9,52 ±0,79	9,46 ± 0,84

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; --- óbito após a coleta sangüínea.

DP – desvio padrão

Tabela A9. Colonização bacteriana, por animal, nos grupos submetidos a indução de pancreatite aguda.

	Animal / órgão	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	P	0	1	0	0
	F	0	0	1	0
	B	0	0	1	0
	LN	0	0	1	0
	LP	0	0	1	0
2	P	0	1	1	1
	F	0	1	1	1
	B	0	0	1	0
	LN	1	0	1	1
	LP	0	1	0	1
3	P	1	1	1	0
	F	1	1	0	1
	B	0	1	1	0
	LN	0	1	0	0
	LP	1	1	0	0
4	P	0	0	1	1
	F	1	1	1	1
	B	0	0	0	1
	LN	0	1	1	1
	LP	0	0	0	1
5	P	1	1	0	1
	F	1	0	0	0
	B	0	0	0	0
	LN	1	1	1	0
	LP	1	0	0	0
6	P	1	1	0	1
	F	1	1	1	1
	B	1	1	0	0
	LN	0	1	1	1
	LP	0	1	0	0
7	P	0	1	1	1
	F	0	1	0	1
	B	1	1	0	0
	LN	0	1	1	1
	LP	0	0	0	0
8	P	1	1	0	1
	F	1	1	1	1
	B	1	1	0	0
	LN	1	1	1	1
	LP	1	1	0	0
9	P		1		1
	F		1		1
	B	Óbito	1	Óbito	0
	LN		1		1
	LP		0		0

10	P				0
	F				0
	B	Óbito	Óbito	Óbito	0
	LN				1
	LP				0

P – pâncreas; F – fígado; B – baço; LN – linfonodo ileal; LP – líquido peritoneal
0 – colonização ausente; 1 – colonização presente