NARA LIMEIRA HORST

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA RESPOSTA A PANCREATITE AGUDA EM RATOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito final para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2006

NARA LIMEIRA HORST

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA RESPOSTA A PANCREATITE AGUDA EM RATOS

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2006.

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Andy Petroianu
Universidade Federal de Minas Gerais

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

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS
BIBLIOTECA DO CENTRO BIOMÉDICO A – CB/A

H819 Horst, Nara Limeira
Suplementação dietética com bactérias probióticas na resposta a pancreatite aguda em ratos / Nara Limeira Horst – 2006.
xiv, 70f. : il.

Orientador: Ruy Garcia Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Suplementos dietéticos – Teses. 2. Pancreatite – Teses. 3. Intestinos – Microbiologia – Teses 4. Nutrição – Teses I. Marques, Ruy Garcia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 613.2

À minha mãe Suzana e aos meus irmãos, Bruno e Breno, que nunca deixaram de apoiar minhas escolhas.

Ao meu saudoso pai Guanayr, que despertou em mim o interesse pela Área da Saúde.

Ao meu orientador Ruy, que, com paciência e carinho, transformou uma árdua jornada num pitoresco passeio rumo ao conhecimento.

Ao meu melhor amigo, Frederico José, que me acompanhou incansavelmente durante as longas horas de dedicação a esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

O ser humano que acredita se bastar, engana-se profundamente. Eu não seria capaz de executar esta pesquisa, desde suas etapas iniciais até a sua conclusão, sem a contribuição de várias pessoas às quais tenho profundo apreço e gratidão.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ruy Garcia Marques, por ter me acolhido e apostado em minha capacidade e por ter transmitido seus conhecimentos durante todas as fases da pesquisa, mas, principalmente, por ter me acompanhado ao longo de todas as etapas, retirando os percalços para que o caminho trilhado fosse o mais suave possível.

Ao Professor Dr. Paulo de Assis Melo e ao Dr. Yugo de Lima Brandão Mirakami, do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo ensino da técnica para a indução da pancreatite aguda nos animais.

Ao Dr. Carlos Eduardo Rodrigues Caetano e ao Sr. Domingos Henrique de Souza Peçanha, médico-veterinário e bioterista do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, respectivamente, pela disponibilidade, dedicação e auxílio nos trabalhos no laboratório, principalmente na realização dos procedimentos cirúrgicos dos animais.

Ao Professor Dr. Arnaldo Feitosa Braga Andrade e ao Sr. Denílson Ferreira Batista, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pela realização da cultura microbiológica com muito carinho, organização e dedicação.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos de Aguiar Vaz, Professor Adjunto da Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pelo auxílio na avaliação histopatológica do pâncreas dos animais.

Ao Biólogo Vagner Ismerim Lobão, Chefe do Laboratório Central e de Urgências do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, pela análise bioquímica do sangue coletado.

À Professora Margareth Crisóstomo Portela, Pesquisadora do Departamento de Administração e Planejamento em Saúde – ENSP – FIOCRUZ, pela colaboração na análise estatística dos resultados do experimento.

À minha grande amiga, Nutricionista Cristina Fajardo Diestel, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIRURGIA) – UERJ, por ter “aberto as portas” do Laboratório de Cirurgia Experimental para a minha entrada no grupo responsável pela linha de pesquisa “Nutrição Experimental em Cirurgia” e pelo constante apoio, compreensão e ensinamento, desde quando eu ainda era residente do Programa de Nutrição em Cirurgia do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ.

Aos meus grandes amigos, Cristiane D’Almeida e Rubens Kesley Paiva, casal que muito admiro, pelo apoio em vários momentos e por terem me transmitido suas experiências na área de pesquisa.

Às minhas “R1” do Programa de Nutrição em Cirurgia do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, Bianca D’Elia Matzke e Fernanda Correia Simões, atualmente Mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIRURGIA) – UERJ, pelo auxílio no cuidado com os animais nas minhas impossibilidades e pelo apoio nas longas horas de experimento.

À minha “quase R1”, Ana Paula Gonçalves Dinis, pela grande ajuda na realização do experimento.

À minha família, principalmente minha mãe, Suzana Limeira Horst, e meus irmãos, Bruno Limeira Horst e Breno Limeira Horst, pelo amor e suporte familiar, indispensáveis para que eu alcançasse a paz de espírito exigida nesse momento da minha vida.

A todas as colegas e à Chefia do Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ, pelo apoio e compreensão de minhas ausências e trocas de plantões, durante a realização desta Pós-graduação.

A todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 – INTRODUÇÃO	5
2 – OBJETIVOS	11
2.1 – OBJETIVO GERAL	11
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 – MÉTODO	12
3.1- ANIMAIS E GRUPOS	12
3.2- COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO	13
3.3- SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS	13
3.4- CONTROLE DE PESO E DE INGESTÃO DE RAÇÃO E ÁGUA	14
3.5- PROCEDIMENTO OPERATÓRIO E INDUÇÃO DA PANCREATITE	14
3.6- COLETA DE AMOSTRAS SANGÜÍNEAS	17
3.7- ANÁLISE LABORATORIAL	18
3.8- RETIRADA DAS PEÇAS OPERATÓRIAS	18
3.9- ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	19
3.10- ESTUDO MICROBIOLÓGICO	20
3.11- ANÁLISE ESTATÍSTICA	21

3.12- ASPECTOS ÉTICOS NO CUIDADO COM OS ANIMAIS 22

4 – RESULTADOS 24

4.1- EVOLUÇÃO DOS ANIMAIS 24

4.2- EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE RAÇÃO 24

4.2.1- Peso corporal 24

4.2.2- Ingestão de água e de ração 26

4.3- EVOLUÇÃO DOS RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS 26

4.4- CULTURA DE MICRORGANISMOS 30

4.5- ESTUDO HISTOPATOLÓGICO 34

5 – DISCUSSÃO 38

6 – CONCLUSÃO 50

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

ANEXO 65

LISTA DE TABELAS

	Página
Tab. 1. Valores de média ± desvio padrão das variáveis consumo de ração e de água e peso corporal, em D1 e D15, e a diferença de peso corporal médio, entre D15 e D1, nos três grupos de animais.	**25**
Tab. 2. Comparação dos grupos de animais quanto ao consumo de ração e de água, entre D1 e D15.	**26**
Tab. 3. Comparação dos grupos de animais em relação à contagem de leucócitos e aos parâmetros bioquímicos, com base no teste-t.	**29**
Tab. 4. Proporção de culturas positivas para microrganismos aeróbicos, em relação ao número de animais em cada grupo de estudo.	**32**
Tab. 5. Proporção de tecidos com culturas positivas para microrganismos aeróbicos, em relação ao número de animais em cada grupo de estudo.	**32**
Tab. 6. Colonização bacteriana observada nos animais dos grupos II e III.	**33**
Tab. 7. Comparação dos animais do grupo III *vs.* grupo II quanto ao risco de colonização bacteriana.	**34**
Tab. 8. Análise histopatológica do tecido pancreático nos animais dos grupos II e III.	**36**

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Indução da pancreatite aguda: A e B – ducto biliopancreático dissecado, com pinçamento do duodeno junto à papila, sem e com magnificação da imagem, respectivamente; C – inoculação de taurocolato de sódio no ducto biliopancreático.	**16**
Fig. 2. Evolução do peso corporal dos animais, entre D1 e D15.	**25**
Fig. 3. Evolução dos valores médios da leucometria (10^3 / mm^3) nos três grupos de animais.	**27**
Fig. 4. Evolução dos valores médios da glicemia (A), amilasemia (B), lipasemia (C) e calcemia (D) nos três grupos de animais.	**28**
Fig. 5. Valores observados para a leucometria, em cada animal, nos três grupos de estudo, nos três diferentes momentos de coleta.	**30**
Fig. 6. Valores observados para os parâmetros bioquímicos, em cada animal, nos três grupos de estudo, nos três diferentes momentos de coleta.	**31**
Fig. 7. Pancreatite aguda: A – líquido peritoneal sero-sangüinolento; B e C – aspecto macroscópico das alterações parenquimatosas e da esteatonecrose.	**35**
Fig. 8. Fotomicrografias do tecido pancreático nos animais dos diversos grupos de estudo: A – grupo I, pâncreas	**37**

normal; B e C – grupos II e III, respectivamente – extensas lesões acinares, com áreas de hemorragia e de infiltrado leucocitário polimorfonuclear, em meio a tecido pancreático normal. Em A e B, identificam-se células de ilhotas pancreáticas (setas). Barra = 100 µm

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – percentual

µm – micrômetro

µL – microlitro

a. C. – antes de Cristo

B – baço

BHI – B*rain Heart Infusion*

cc – centímetro cúbico

cm – centímetro

D.A.U. – duplo açúcar + uréia

D1 – dia 1

D15 – dia 15

dl – decilitro

dp – desvio padrão

EUA – Estados Unidos da América

F – fígado

g – grama

GALT – tecido linfóide associado ao intestino

H_2O_2 – água oxigenada

H_2S – ácido sulfídrico

IgA – imunoglobulina A

IgM – imunoglobulina M

Inf. leucoc. – infiltrado leucocitário

LN – linfonodo

LP – líquido peritoneal

min – minuto

ml – mililitro

mm – milímetro

mm^3 – milímetro cúbico

MODS – síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

NE – nutrição enteral

NP – nutrição parenteral

º C – grau Celsius

OR – *odds ratio*

P – pâncreas

PA – pancreatite aguda

pH – potencial de hidrogênio iônico

RR – risco relativo

S.I.M. – sulfeto-indol-mobilidade

SBID – supercrescimento bacteriano no intestino delgado

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UFC – unidades formadoras de colônias

UI – unidade internacional

vs. – versus

RESUMO

A pancreatite aguda grave apresenta alta morbimortalidade, notadamente pela resposta inflamatória sistêmica e pela necrose pancreática associada a infecção, possivelmente decorrente de translocação bacteriana. Os microrganismos responsáveis pela infecção pancreática secundária são, freqüentemente, bactérias gram-negativas, como as que habitualmente colonizam o trato digestório, o que sugere a ocorrência de disfunção da barreira intestinal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética com bactérias probióticas na resposta a pancreatite aguda em ratos. Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos adultos, aleatoriamente distribuídos em três grupos: I – controle – operação simulada, sem indução de pancreatite aguda; II – indução de pancreatite aguda; III – indução de pancreatite aguda, com administração prévia de bactérias probióticas. Os animais do Grupo III receberam, durante 14 dias, suplementação dietética com probióticos contendo a combinação das seguintes cepas de bactérias: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*. Cada animal recebeu cerca de 1,2 x 10^9 unidades formadoras de colônias desses microrganismos. No 15.º dia do experimento, os animais foram submetidos a operação simulada (Grupo I) ou a indução de pancreatite aguda (grupos II e III), pela inoculação de taurocolato de sódio a 5% no ducto biliopancreático. Foram coletadas amostras sangüíneas para análise bioquímica das concentrações de amilase, lipase, glicose e cálcio, além de contagem leucocitária, imediatamente antes do procedimento e 6 e 12 horas após o procedimento. Após a última coleta sangüínea, os animais foram submetidos a nova laparotomia para coleta de amostras de líquido peritoneal, linfonodo mesentérico, pâncreas, baço e fígado, para análise microbiológica. A análise estatística foi realizada com os testes t, exato de Fisher e

Kruskal-Wallis. Considerou-se um valor de $p \leq 0,05$ para a rejeição da hipótese nula de similaridade dos grupos. Os animais do Grupo III apresentaram maior elevação do número de leucócitos, em comparação aos animais dos demais grupos. Embora os parâmetros bioquímicos analisados não tenham diferido significativamente entre os animais dos grupos II e III, observou-se que tanto a amilasemia quanto a lipasemia dos animais do Grupo II tenderam a permanecer mais elevadas em comparação aos animais do Grupo III. Houve um número maior de culturas positivas nos animais do grupo III, em comparação ao encontrado nos animais do Grupo II, mas a análise estatística não mostrou haver maior risco de colonização bacteriana nos animais do Grupo III. Nossos resultados sugerem que a suplementação dietética com essas cepas de bactérias probióticas, na concentração utilizada, parece não influenciar a ocorrência de translocação bacteriana na pancreatite aguda induzida, apesar de promover alterações menos intensas em alguns dos parâmetros bioquímicos avaliados.

ABSTRACT

Severe acute pancreatitis presents an elevated morbidity and mortality attributable to sistemic response to inflammation and infection associated with pancreatic necrosis, possibly determined by bacterial translocation. The microrganisms responsible for the secondary pancreatic infection are commonly gram-negative bacteria like those who habitually colonize digestive tract, suggesting disruption of intestinal barrier. This study was aimed at evaluating the effect of probiotic bacteria supplementation on acute pancreatitis induced in rats. Thirty adult male Wistar rats were used, randomly distributed into three groups: I – control – sham-operated without induction of acute pancreatitis; II – induction of acute pancreatitis, without probiotic supplementation; III – induction of acute pancreatitis, with previous supplementation with probiotics. Animals from group III received, during 14 days, a probiotic mixture containing a combination with the following strains: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium longum*. Each animal received a single diary dose containing about 1.2 x 10^9 colony units forming of these microrganisms. On the 15^{th} day of the experiment the animals were submitted to simulated operation (group I) or to the induction of acute pancreatitis (groups II and III) by the inoculation of 5.0% sodium taurocholate solution into the biliopancreatic duct. Blood samples were collected for biochemical analysis of the concentrations of amylase, lipase, glucose, and calcium, and leukocyte count, immediately before the beginning of the procedure, and 6 and 12 hours after. Following the last blood sample collection the animals were submitted to a new laparotomy and samples of peritoneal liquid, mesenteric lymph node, pancreas, spleen and liver were obtained for microbiologic analysis. Statistical analysis was performed using t-test, Fisher exact test and Kruskal-Wallis test. A

value of $p \leq 0.05$ was considered for the rejection of null hypothesis of similarity of the groups. Group III animals presented a greater elevation of leukocytes compared to the animals of the other groups. Although the biochemical parameters analyzed did not significantly differ between the animals of groups II and III, both amylasemia and lipasemia of the animals of group II exhibited a tendency to remain more elevated in comparison to the animals of group III. There were a large number of positive cultures in the animals of group III compared to the animals of group III, but the statistical analysis did not showed a higher risk of bacteria colonization in the animals of group III. Our findings suggest that the dietetic supplementation with these probiotics strains, at the concentration utilized, does not seem to influence bacterial translocation but promotes fewer alterations of some of the biochemical parameters analyzed.

1 – INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) pode ser definida como um processo inflamatório do pâncreas, de gravidade variada, causado pela ativação intracelular, liberação intersticial e digestão da glândula por suas próprias enzimas proteolíticas.[1] A inflamação pode limitar-se ao pâncreas ou acometer órgãos vizinhos e a distância, eventualmente levando a disfunção orgânica múltipla.[2-4]

Aproximadamente 80% dos pacientes com PA apresentam um processo inflamatório autolimitado, de rápida resolução, que acomete apenas o pâncreas e, por vezes, tecidos peripancreáticos.[4] Esses casos menos graves necessitam, em geral, de um curto período de jejum, hidratação venosa, infusão de eletrólitos e analgesia e, quando presentes, as deficiências nutricionais são pequenas e facilmente reversíveis.[5,6]

Na PA grave, contudo, é comum a ocorrência de variados graus de necrose parenquimatosa, em associação a complicações locais e sistêmicas, como as síndromes da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e da disfunção de múltiplos órgãos (MODS). Essa forma da doença representa um modelo típico de sepse hipermetabólica, com aumento considerável da necessidade energética de repouso e do catabolismo protéico, freqüentemente determinando um quadro de desnutrição grave.[7,8]

O repouso do trato gastrointestinal, com ou sem fornecimento de nutrição parenteral (NP), tem sido considerado o cuidado-padrão, haja vista que minimiza, sobremaneira, a excreção pancreática exócrina. Entretanto, inúmeros estudos experimentais e em humanos sugerem que, nesses casos, a administração de nutrição enteral (NE) é possível, e mesmo benéfica, desde que não determine aumento na produção exócrina e seja bem tolerada.[9-11] Além do menor custo e da

ausência de complicações relacionadas ao cateter, que freqüentemente ocorrem na NP, a NE apresenta a vantagem de prevenir alterações na barreira mucosa e na permeabilidade intestinal.[12] Marik e Zaloga (2004) verificaram que a utilização de NE associa-se a incidência menor de infecções, de intervenções cirúrgicas e do tempo de hospitalização, quando comparada à NP, embora não determine diferença no que se refere à mortalidade e à incidência de complicações não-infecciosas.[13]

Muitos pacientes com PA grave evoluem para óbito nas primeiras duas semanas após o início da doença, notadamente devido a MODS, mas a morbidade e mortalidade tardias são conseqüências da resposta imunoinflamatória à necrose ou à infecção pancreáticas.[14]

Independentemente da etiologia da PA, a resposta do sistema imune parece ser idêntica, diferindo apenas no grau em que se expressa. O resultado final é uma elevada produção de mediadores inflamatórios que contribui para a progressão da doença, inicialmente local, tornando-a um processo sistêmico.[15] O processo inflamatório localizado é amplificado pela ação de citocinas, de radicais livres de oxigênio e de enzimas proteolíticas e lipolíticas, que induzem o surgimento da SIRS, que, apesar de considerada como uma resposta normal à lesão do hospedeiro, quando persistente ou exagerada pode contribuir para o desenvolvimento de MODS.[16,17]

Como a infecção da necrose pancreática é a complicação local considerada de maior gravidade e determina alta mortalidade, muitos autores sugerem a utilização de antibioticoprofilaxia com o intuito de prevenir tal evolução.[17] Entretanto, não existe consenso para o uso profilático desses medicamentos, nem mesmo visando a descontaminação seletiva do intestino, haja vista que podem desestabilizar a flora intestinal e alterar a integridade da superfície epitelial.[11,18,19]

O epitélio intacto do intestino, associado a flora adequada, representa uma barreira à invasão de microrganismos patogênicos, de antígenos e de componentes nocivos que podem estar presentes no lúmen intestinal. Em indivíduos saudáveis, essa barreira é estável e desempenha a sua função habitual, assegurando resistência imunológica ao hospedeiro.[20]

A composição da flora intestinal é influenciada por 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 digestório (pH, tempo de trânsito intestinal, disponibilidade de substratos).[20] Quando um desses fatores se altera pode ocorrer um desequilíbrio (disbiose), caracterizado pelo declínio de bactérias benéficas e pela proliferação de bactérias potencialmente patogênicas.[21,22]

Os microrganismos responsáveis pela infecção pancreática secundária são, freqüentemente, bactérias gram-negativas, como as que colonizam o trato gastrointestinal, o que sugere a ocorrência de disfunção da barreira mucosa.[23] O termo translocação bacteriana foi cunhado por Berg e Garlington (1979) para definir a passagem de microrganismos patogênicos e não-patogênicos e de seus produtos (p. ex., endotoxinas) do lúmen intestinal para linfonodos mesentéricos e, possivelmente, para outros órgãos.[24] Na atualidade, esse conceito tem recebido atenção crescente da comunidade científica e tem sido definido como um processo no qual bactérias que normalmente residem no lúmen do trato gastrointestinal cruzam a parede intestinal e podem determinar a estimulação do sistema imune e a infecção em tecidos estéreis. Isso poderia resultar em reação inflamatória maciça e causar disfunção de múltiplos órgãos, com elevada mortalidade.[25]

A translocação bacteriana representa, notadamente, três fatores fisiopatológicos: (1) dano à motilidade intestinal, levando a um supercrescimento bacteriano no intestino delgado; (2) lesão estrutural da barreira mucosa; e (3) deficiência do sistema imune.[26-28] Em indivíduos saudáveis, o ácido gástrico, a bile e o complexo motor intestinal contribuem para a reduzida contagem bacteriana no intestino delgado. A ruptura no equilíbrio microbiano habitual resulta em disfunção da barreira mucosa, facilitando a translocação de patógenos oportunistas. Com o rompimento dessa barreira, a exposição de bactérias às células do sistema imune iniciará a sinalização para uma resposta de defesa do hospedeiro.[29]

A PA grave é uma das doenças abdominais mais associadas ao íleo paralítico e essa disfunção intestinal possivelmente modula a intensidade da resposta inflamatória que, além de favorecer a translocação bacteriana, constitui fonte adicional para a liberação de citocinas pró- e antiinflamatórias, decorrentes de produtos bacterianos absorvidos.[5,25,29,30]

A “sepse derivada do intestino” parece ser um evento com baixo potencial inflamatório e, por isso, se constituiria em um estímulo insuficiente para a resposta sistêmica e para a disfunção orgânica que ocorrem após um processo catabólico grave e prolongado.[31,32] Entretanto, esse cenário se modifica quando uma bactéria encontra as condições adequadas para expressar a amplitude de sua virulência, como ocorre em situações de extenso estresse. Essas situações são, habitualmente, indicadas pelo hospedeiro, constituindo exemplos as alterações do pH e da osmolalidade intestinal ou o aumento da produção de determinados hormônios. Essas alterações indicariam a existência de um ambiente hostil e estimulariam as bactérias à procura de locais em que existissem melhores condições para a sua

sobrevivência, mas a capacidade da bactéria em iniciar ou exacerbar uma resposta inflamatória também depende de sua aptidão em colonizar outros órgãos.[33,34]

O trato digestório abriga uma flora composta por mais de 500 espécies de microrganismos, algums dos quais desempenham funções importantes na manutenção da homeostase. Esses microrganismos compõem uma comunidade dinâmica que, uma vez estabelecida, permanece relativamente constante ao longo da vida. O equilíbrio entre a flora benéfica e a flora potencialmente patogênica é fundamental, haja vista que o supercrescimento de uma espécie pode alterar a função digestória e favorecer a translocação bacteriana.[18,35-37]

Na tentativa de normalizar ou estabilizar a flora bacteriana, têm sido utilizados probióticos, microrganismos vivos não-patogênicos que, quando ingeridos em quantidade adequada, afetam beneficamente o hospedeiro, pela melhoria das propriedades de sua flora habitual. Eles consistem de bactérias (principalmente as produtoras de ácido lático e as bifidobactérias) e leveduras (notadamente *Saccharomyces*) que podem estar presentes tanto em alimentos (leite fermentado) como em suplementos alimentares e em medicamentos.[38-40] Seu mecanismo de ação é considerado variado, existindo condições clínicas em que seu uso pode ser benéfico (p. ex., infecção, inflamação, alergia e câncer).[41] Acredita-se que seus efeitos podem ser diretos ou indiretos, pela modificação do ecossistema endógeno ou da resposta imune, respectivamente. A versatilidade da ação direta dos probióticos pode ser explicada pelas múltiplas interações entre os microrganismos e entre eles e o hospedeiro.[5,41-43]

Como exemplo da interação entre os microrganismos, destaca-se a competição por nutrientes essenciais e a produção de fatores antimicrobianos pelos probióticos, impedindo o supercrescimento de patógenos. Contudo, em

contraposição, os probióticos também podem agir suscitando a tênue ativação do sistema imunológico do hospedeiro, como ocorre quando eles alcançam o intestino e estabelecem uma população residente de imunócitos. Isso, ocasionalmente, poderia favorecer a ocorrência de uma rápida resposta de defesa contra patógenos que invadam a lâmina própria intestinal.[44]

Pesquisas em animais e em humanos têm sido realizadas com o intuito de estabelecer a eficácia do uso de preparações probióticas.[45] Entretanto, apesar dos resultados encorajadores de alguns estudos, em certas circunstâncias (intolerância à lactose e diarréia, p. ex.), a elucidação da real aplicabilidade dos probióticos ainda é objeto de dúvida, haja vista a discrepância dos resultados advindos de sua utilização no homem.[38,44,46,47]

No que concerne à PA, a despeito do reconhecimento de importantes fatores de risco para a sua ocorrência, ainda não se consegue distinguir os pacientes que desenvolverão a doença. Adicionalmente, uma vez instalado o quadro inflamatório pancreático, ainda não se dispõe de marcadores objetivos que detectem prontamente os pacientes que evoluirão para complicações, como, p. ex., necrose e infecção pancreáticas. A manipulação da flora intestinal, pela suplementação dietética com probióticos poderia contribuir para a atenuação da resposta a PA, minimizando a morbimortalidade dela decorrente.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

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

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar se a adição de bactérias probióticas à dieta modifica os valores de exames laboratoriais habitualmente utilizados no diagnóstico e no acompanhamento da pancreatite aguda.

Verificar se a adição de bactérias probióticas à dieta previne a translocação bacteriana intestinal.

3 – MÉTODO

Utilizou-se um modelo experimental com ratos *Wistar* machos adultos submetidos a suplementação dietética com bactérias probióticas, durante 14 dias. No 15.º dia, os animais foram submetidos a indução de pancreatite aguda, por inoculação de solução de taurocolato sódico a 5% (Taurocholic acid® – Sigma®) no ducto biliopancreático. O material coletado (amostras sangüíneas e peças operatórias) foi encaminhado para análise bioquímica, histológica e microbiológica.

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, com a colaboração das Disciplinas de Microbiologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas e do Laboratório Central e de Urgências do Hospital Universitário Pedro Ernesto – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.1 – ANIMAIS E GRUPOS

Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso inicial entre 300 e 350 gramas. Esses animais foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos de estudo, cada um com dez animais:

I – Controle – com oferta de ração-padrão e realização de operação simulada, sem indução de pancreatite aguda;

II – com oferta de ração-padrão e indução de pancreatite aguda;

III – com oferta de ração-padrão, suplementação dietética com bactérias probióticas durante 14 dias e indução de pancreatite aguda.

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 foram mantidos em condição-padrão de laboratório durante o período do experimento, recebendo dieta apropriada (Focus 1722 Roedores® – Agroceres®) e água *ad libitum*.

Os ratos foram alojados em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, com foto-períodos diários de 12 horas. Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram deixados em jejum por 12 horas.

No 15.º dia do experimento, os animais do Grupo I foram submetidos a laparotomia e manuseio de órgãos intra-abdominais (operação simulada) e os animais dos grupos II e III foram submetidos a laparotomia para indução de pancreatite aguda.

3.2 – COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO

A ração padrão utilizada (Focus 1722 Roedores® – Agroceres®) 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%.

A ração era enriquecida com vitamina A, vitamina E, vitamina K_3, vitamina B_1, vitamina B_2, vitamina B_6, vitamina B_{12}, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, DL-metionina, lisina, aditivo antioxidante, ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio e cobalto.

3.3 – SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

A suplementação de bactérias probióticas foi realizada com o Vital-Imune Biotic® (Klaire Labs®) que é comercializado em cápsulas com a seguinte composição, no que concerne ao número de unidades formadoras de colônias

(UFC): *Lactobacillus rhamnosus* – 1,2 x 10^9; *Lactobacillus casei* – 0,9 x 10^9; *Lactobacillus acidophilus* – 0,6 x 10^9; e *Bifidobacterium longum* – 0,3 x 10^9.

A dose diária foi preparada pela dissolução de quatro cápsulas em 50 ml de água filtrada. Cada animal do Grupo III recebeu 5 ml da solução (1,2 x 10^9 UFC), por administração intragástrica, em *bolus*, com a utilização de um cateter orogástrico siliconizado n.º 4 (Embramed®), uma vez ao dia, no mesmo horário.

Os animais dos grupos I e II receberam 5 ml de água filtrada, por via intragástrica, durante os 14 dias do experimento, administrada da mesma forma descrita anteriormente, sempre no mesmo horário.

3.4 – 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 (Adventure™ – Ohaus®). O consumo de ração foi medido 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.

3.5 – PROCEDIMENTO OPERATÓRIO E INDUÇÃO DA PANCREATITE

No 15.º dia do experimento, os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia inalatória com halotano (Fluothane®, Zeneca Farmacêutica do Brasil Ltda® – Cotia, SP, Brasil) e posterior tricotomia ampla da parede abdominal. A anti-sepsia da parede abdominal foi realizada com solução de polivinilpirrolidona-iodo com 10% de iodo ativo (Povidine Degermante® – Rioquímica®) e, em seguida, com solução de polivinilpirrolidona-iodo com 1% de iodo ativo (Povidine Alcoólico® – VIC Pharma Ind. e Com. Ltda®).

Todo o procedimento operatório foi realizado sob condição estéril, obedecendo aos cuidados de assepsia e anti-sepsia. Na operação de cada animal utilizou-se um *kit* de material cirúrgico estéril que continha: um campo cirúrgico fenestrado, um cabo de bisturi n.º 3, uma lâmina de bisturi n.º 15, uma tesoura de Metzenbaum curva delicada, um mini-afastador auto-estático, duas pinças de Hartmann-Halsted, uma pinça vascular tipo *bulldog*, uma pinça de dissecção anatômica, uma pinça de dissecção dente-de-rato e um porta-agulha de Hegar.

O acesso à cavidade abdominal do animal foi realizado por laparotomia mediana supra-umbilical, com cerca de 3 cm de extensão.

Nos animais do Grupo I procedeu-se à manipulação de órgãos intra-abdominais, seguida por fechamento da parede abdominal.

Nos animais dos grupos II e III, o fígado foi deslocado superiormente e o duodeno inferiormente, para identificação do ducto biliopancreático. O ducto foi dissecado e reparado com fio de linho 2-0 (Linho® – Ethicon®). O duodeno foi fechado com uma pequena pinça aplicada junto à região da papila, para evitar a passagem do taurocolato de sódio para a luz intestinal. Para melhor visualização das estruturas anatômicas, utilizou-se magnificação de cinco vezes da imagem, com lupa RT 202.03 (Ritek® – Taiwan).

O ducto biliopancreático foi puncionado com agulha 0,45 x 13 cm (Plascalp®) acoplada a uma seringa com capacidade para 1 ml (3/10cc – BD®), seguindo-se inoculação de 0,2 µL de solução de taurocolato de sódio a 5%, a uma velocidade aproximada de infusão de 0,1 µL/min, sob pressão manual. Para manter constante e amortecer a pressão de infusão da substância, foi criada uma câmara gasosa no interior da seringa. (Fig. 1)

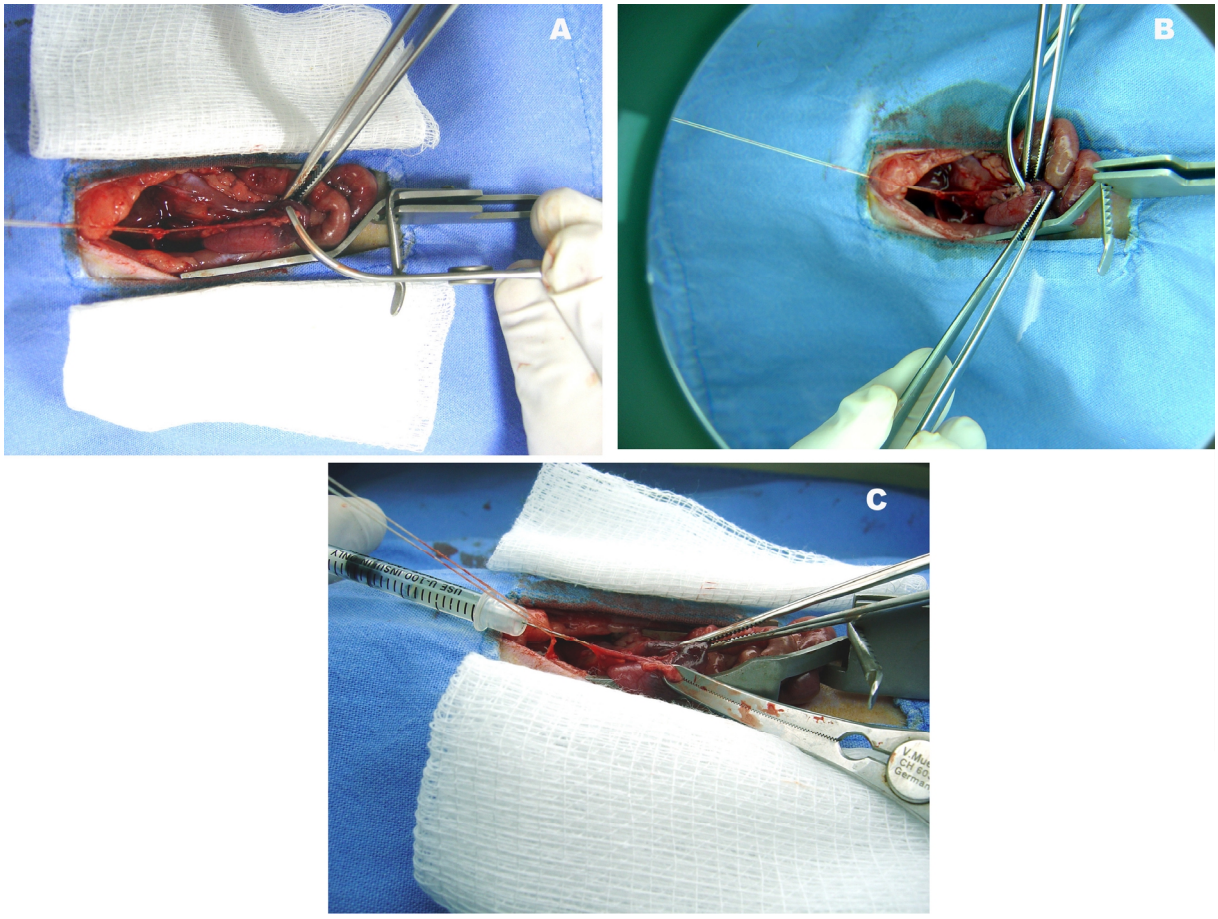


Fig. 1. Indução da pancreatite aguda: A e B – ducto biliopancreático dissecado, com pinçamento do duodeno junto à papila, sem e com magnificação da imagem, respectivamente; C – inoculação de taurocolato de sódio no ducto biliopancreático.

O fechamento da parede abdominal dos animais de todos os grupos foi realizado em dois planos – peritonioaponeurótico e pele – com fio de poliglactina 910 2-0 (Vicryl® – Ethicon®). Durante o fechamento da parede abdominal, foram inoculados 10 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% no tecido celular subcutâneo de todos os animais.

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

3.6 – COLETA DE AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Por punção cardíaca, sob anestesia inalatória com halotano, foram coletadas amostras sangüíneas dos ratos para análise dos níveis séricos de amilase, lipase, glicose e cálcio, bem como contagem de leucócitos, imediatamente antes dos procedimentos operatórios (hora 0) e após 6 e 12 horas. A última coleta foi realizada imediatamente antes da retirada das peças operatórias para exame histológico e microbiológico.

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 polivilpirrolidona-iodo com 1% de iodo ativo.

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.

Logo após o acondicionamento nos tubos, o sangue destinado à análise bioquímica foi centrifugado, durante dez minutos, a 4.000 rotações por minuto, em centrífuga clínica (Centrífuga Excelsa Baby II 206-R®, FANEM – São Paulo, SP).

3.7 – ANÁLISE LABORATORIAL

A análise laboratorial foi realizada por um técnico do Laboratório Central e de Urgências do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ) que não tinha conhecimento dos grupos do estudo.

Para a análise laboratorial, foram utilizadas técnicas diversas, a saber:

- contagem de leucócitos – método Laser/Impedância;
- glicose – método enzimático GOD-PAP (oxidase);
- cálcio – técnica colorimétrica Arzenato III;
- amilase – método cinético (CNP G3); e
- lipase – técnica enzimática colorimétrica.

Para a análise dos níveis séricos de glicose, cálcio, amilase e lipase foi utilizado o equipamento Konelab® (Wiener®), com emprego do *kit* reagente BT 3000® (Wiener®), enquanto para a contagem leucocitária utilizou-se o equipamento Cell Dyn 3700® (Abbott®).

3.8 – RETIRADA DAS PEÇAS OPERATÓRIAS

Sob anestesia inalatória com halotano, os animais de todos os grupos foram submetidos a reoperação na 12.ª hora após a indução da pancreatite (grupos II e III) ou após a operação simulada (Grupo I), para a ressecção de tecidos para análise microbiológica e histológica.

A retirada das peças operatórias seguiu rígido controle microbiológico, com utilização de material estéril e equipe cirúrgica devidamente paramentada.

Segmentos do pâncreas, do baço, do fígado e de linfonodo mesentérico, além de uma amostra do líquido peritoneal, foram retirados e colocados em frascos estéreis, sendo encaminhados para análise microbiológica.

Após a coleta dos tecidos para exame, todos os animais foram mortos por sobredose anestésica (halotano) e submetidos ao fechamento da parede abdominal em dois planos – peritônio-aponeurótico e pele – com fio de poliglactina 910 2-0 (Vicryl® – Ethicon®).

3.9 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

A avaliação histopatológica foi realizada por um patologista da Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ que não tinha conhecimento dos grupos do estudo.

O tecido pancreático foi processado em soluções crescentes de álcool e xilol, e, em seguida, incluídos em blocos de parafina (Parafina para Histologia® – Isofar, Indústria e Comércio de Produtos Químicos – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cortado, com o auxílio de um micrótomo (Leica RM20225®, *Leica Instruments* – China), 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 (Laborlux S®, Ernest Leitz – Leitz Portugal).

Para a avaliação histopatológica da PA, foram avaliadas a presença ou ausência dos seguintes parâmetros: esteatonecrose (ação de fosfolipases), lise acinar (ação da tripsina), hemorragia (ação da elastase) e infiltrado leucocitário (resposta inflamatória). A esses parâmetros atribuiu-se uma gradação, de acordo com a intensidade de acometimento individual do parênquima pancreático dos

animais (0 – ausente; 1 – pequeno; 2 – moderado; e 3 – acentuado), obtendo-se um valor médio em cada um dos grupos (II e III).

3.10 – ESTUDO MICROBIOLÓGICO

A avaliação microbiológica foi realizada por um técnico da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ que não tinha conhecimento dos grupos do estudo.

O líquido peritoneal foi coletado com seringa de 3 ml (Injet® – Plascalp®) e acondicionado em frascos estéreis (Eppendorff), com capacidade para 1,5 ml. O linfonodo mesentérico e os segmentos do pâncreas, do baço e do fígado também foram colocados em frascos estéreis e submetidos a cultura para microrganismos aeróbicos.

Imediatamente após chegarem ao Laboratório de Microbiologia, as amostras foram armazenadas em geladeira, a uma temperatura de 6º C. O intervalo de tempo decorrido entre a chegada do material no laboratório e a realização dos procedimentos para a cultura bacteriana não excedeu ao máximo 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 à temperatura de 36º C, durante 24 horas. Após esse período, foi observado o crescimento bacteriano e identificado o tubo correspondente. Apenas dos tubos onde ocorreu crescimento bacteriano, foi retirado 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 observado o crescimento bacteriano e identificado o tubo correspondente.

As amostras em que ocorreu crescimento bacteriano foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar-sangue (Oxoid Ltd®, Basingstoke – Hampshire, Inglaterra) e incubadas por mais 24 horas a 37º C. Em seguida, executou-se o método de Gram, para separá-las em grupos distintos. Ambas as amostras, gram-positivas e gram-negativas, foram submetidas às provas bioquímicas específicas.

Para as amostras com microrganismos gram-positivos, foram aplicados os testes de catalase (H_2O_2) e coagulase (plasma de coelhos não imunizados), para identificação de cepas de estafilococos e de estreptococos.

Às amostras com microrganismos gram-negativos, foram aplicados os seguintes testes bioquímicos:

- para identificação de bactérias fermentadoras e não fermentadoras: meio Base Descarboxilase–Arginina (Moeller Decarboxylase® – Becton Dickinson SA – França) e OF Glicose (Hugh-Leifson – Merck KGaA® – Darmatadt, Alemanha).

- para identificação de enterobactérias: S.I.M. – sulfeto (H_2S)-indol-mobilidade (Merck KGaA® – Darmatadt, Alemanha), D.A.U. – duplo açúcar (glicose e lactose) + uréia[48] e Ágar Citrato Seg Simmons (Merck® – Brasil).

3.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas realizadas visaram a descrição e comparação dos animais dos três grupos, em relação a: (1) pré-condições para o experimento (consumo diário médio de ração, ingestão diária média de água, diferença do peso corporal em D15 – dia da operação – em relação a D1 e peso corporal no dia operação); (2) exames de amostras sangüíneas – dosagem dos níveis séricos de amilase, lipase, glicose e cálcio, bem como contagem leucocitária, no momento do

procedimento operatório (hora 0) e seis e 12 horas após; e (3) colonização bacteriana no pâncreas, fígado, baço, linfonodo mesentérico e líquido peritoneal.

No intuito de testar a hipótese nula de similaridade dos grupos em relação às pré-condições para o experimento, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (comparação simultânea dos três grupos) e o teste-t (comparação dos grupos, dois a dois).

No que concerne ao efeito das bactérias probióticas sobre os marcadores bioquímicos e sobre a contagem leucocitária nos três diferentes momentos (0 e 6 e 12 horas após indução da pancreatite), optou-se pelo uso do teste-t para a comparação dos grupos dois a dois, vislumbrando a comparação dos animais dos grupos II e III como a de fato relevante para o cenário de ocorrência de pancreatite.

Finalmente, para avaliar o efeito das bactérias probióticas sobre a translocação bacteriana, comparou-se a colonização bacteriana no pâncreas, fígado, baço, linfonodo mesentérico e no líquido peritoneal nos animais dos grupos II e III, pelo teste exato de Fisher.

Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico SAS®,[49] sendo estabelecido um valor de $p \leq 0,05$ como critério para a rejeição da hipótese nula de similaridade dos grupos.

3.12 – ASPECTOS ÉTICOS NO CUIDADO COM OS 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.[50,51]

4 – RESULTADOS

4.1 – EVOLUÇÃO DOS ANIMAIS

Dois animais evoluíram para óbito, um do Grupo I (controle) e um do Grupo III, ambos 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, as análises da segunda e terceira amostras sangüíneas foram realizadas com nove animais.

Todos os demais animais apresentaram recuperação satisfatória após o procedimento cirúrgico e as coletas sangüíneas, permanecendo sem alterações significativas até o final do experimento.

4.2 – EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE RAÇÃO

4.2.1 – Peso corporal

Não houve diferença no peso corporal dos animais dos três grupos, tanto no início do experimento (D1 – dia do início da preparação dos animais) quanto no seu final (D15 – dia da operação simulada nos animais do Grupo I e da indução da pancreatite nos animais dos grupos II e III). Os valores dessas variáveis, assim como os desvios-padrão, podem ser vistos na Tabela 1. A evolução do peso dos ratos entre D1 e D15 foi uniforme em todos os grupos, conforme pode ser observado na Figura 2.

Tab. 1. Valores de média ± desvio padrão das variáveis consumo de ração e de água e peso corporal, em D1 e D15, e a diferença de peso corporal médio, entre D15 e D1, nos três grupos de animais.

Variável	Grupo I (média ± dp)	Grupo II (média ± dp)	Grupo III (média ± dp)	Teste de Kruskal-Wallis (p)
Consumo médio diário de ração (g)	18,71 ± 2,43	18,14 ± 2,08	18,51 ± 1,31	0,6870
Consumo médio diário de água (ml)	34,7 ± 5,31	38,52 ± 3,98	29,86 ± 5,83	0,0089
Peso corporal médio em D1 (g)	331,51 ± 12,05	324,06 ± 10,42	327,29 ± 13,76	0,2444
Peso corporal médio em D15 (g)	334,07 ± 8,74	324,97 ± 9,80	325,97 ± 15,65	0,1634
Diferença de peso entre D15 e D1 (g)	2,57	0,91	- 1,31	0,8041

g – grama; ml – mililitros; dp – desvio padrão

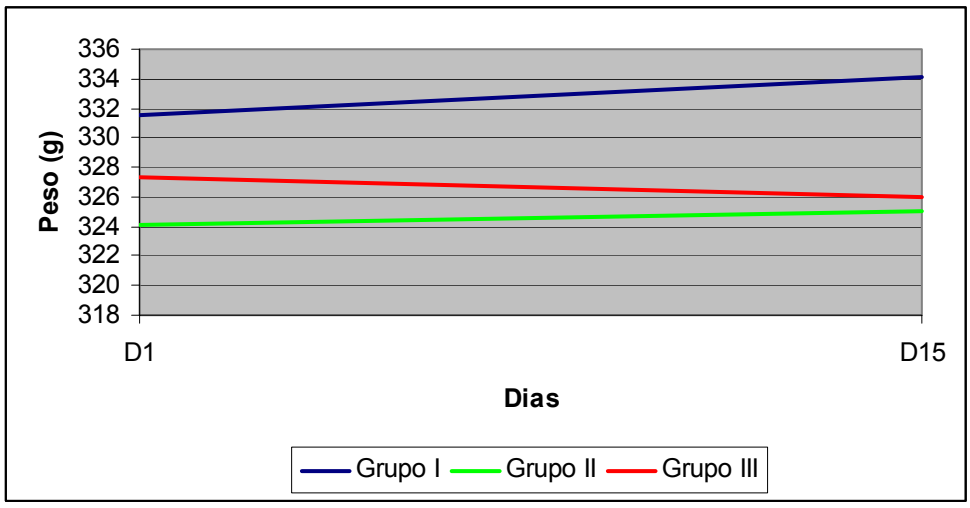


Fig. 2. Evolução do peso corporal dos animais, entre D1 e D15.

4.2.2 – Ingestão de água e de ração

No que se refere ao consumo médio de ração, também não houve diferença em todos os grupos de animais, entre D1 e D15. Contudo, observou-se diferença significativa quanto ao consumo médio de água entre os animais dos grupos II e III, com os animais do Grupo III consumindo menor quantidade. Os valores dessas variáveis, expressos em média ± desvio padrão, podem ser visualizados na tabela 1.

A tabela 2 mostra a comparação dos grupos, dois a dois, no que concerne ao consumo médio de água e ração, com base no teste-t.

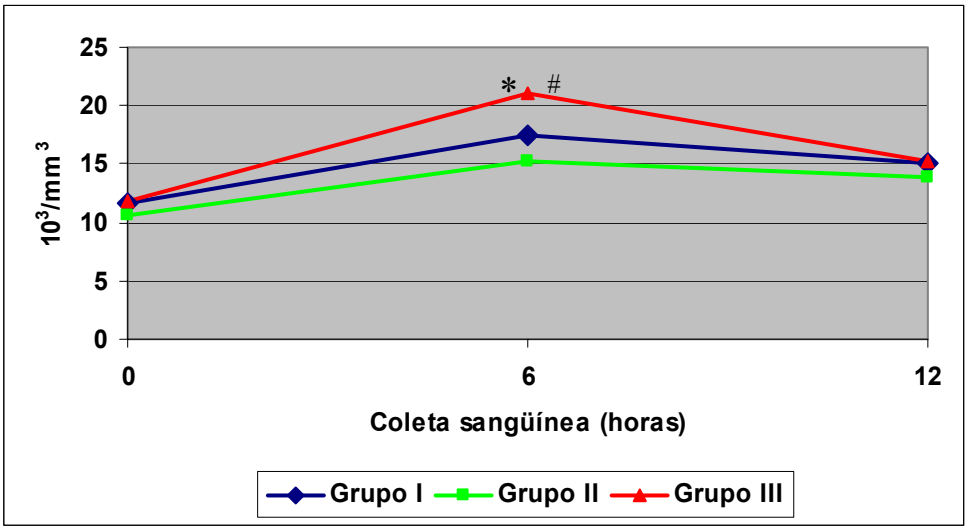
Tab. 2. Comparação dos grupos de animais quanto ao consumo de ração e de água, entre D1 e D15.

Variável	Grupo I *vs.* II (p)	Grupo I *vs.* III (p)	Grupo II *vs.* III (p)
Consumo médio diário de ração (g)	0,5811	0,8240	0,6385
Consumo médio diário de água (ml)	0,0857	0,0684	0,0011

g – grama; ml – mililitros

4.3 – EVOLUÇÃO DOS RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS

Na 6.ª hora após a primeira coleta sangüínea (hora 6), observou-se maior elevação da leucometria nos animais do Grupo III, em relação ao Grupo controle. Apenas nesse momento ocorreu diferença significativa entre os animais dos grupos II e III. Adicionalmente, na 6.ª hora também se observou diferença significativa dos valores médios do número de leucócitos sangüíneos nos animais do Grupo III, em comparação aos animais do Grupo controle. Nas outras duas coletas sangüíneas, os valores médios encontrados para os três grupos de animais foram semelhantes. (Fig. 3)



* p =0,0010 – Grupo III *vs.* II; **#** p =0,0145 – Grupo III *vs*. controle

Fig. 3. Evolução dos valores médios da leucometria (10^3 / mm^3) nos três grupos de animais.

Os valores encontrados para a glicemia foram diferentes nos animais do Grupo II em relação aos do Grupo I (controle), em dois momentos de coleta sangüínea, nas horas 0 e 6 após a indução da pancreatite. Na coleta sangüínea realizada na hora 12, não houve diferença entre nenhum dos grupos analisados. (Fig. 4A)

Os valores médios dos níveis séricos de amilase observados nos animais dos grupos II e III foram significativamente diferentes dos encontrados nos animais do Grupo controle, notadamente no que se refere às elevações observadas na 6.ª e na 12.ª horas após a indução da pancreatite aguda. Depois da 6.ª hora, apenas a amilasemia dos animais do Grupo II se manteve em elevação, porém sem diferença significativa, em comparação ao observado nos animais do grupo III. (Fig. 4B)

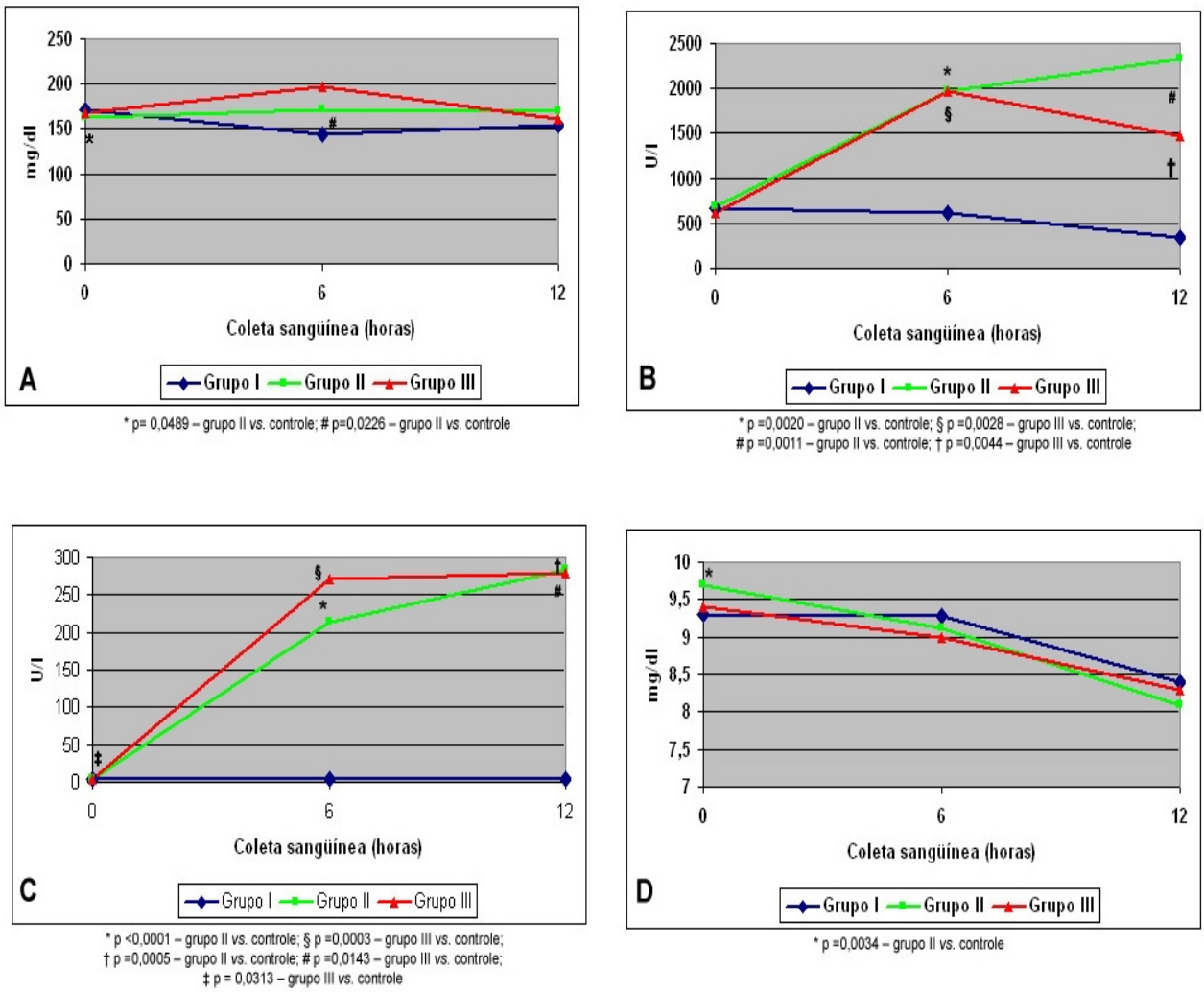


Fig. 4. Evolução dos valores médios da glicemia (A), amilasemia (B), lipasemia (C) e calcemia (D) nos três grupos de animais.

O valor médio basal da lipasemia apresentou diferença entre os animais dos grupos III e I (controle). Também ocorreram diferenças no valor médio dessa variável nos animais dos grupos II e III, tanto na 6.ª hora quanto na 12.ª hora, em comparação aos animais do Grupo controle. Entre os ratos dos grupos II e III, os valores médios observados para a lipasemia, na 6.ª hora, foram maiores no Grupo III (embora sem significância). Na 12.ª hora, enquanto esses valores pareceram se estabilizar nos animais do Grupo III, continuaram se elevando nos animais do Grupo II, porém sem diferença significante. (Fig. 4C)

Antes da indução da pancreatite, os níveis séricos basais de cálcio dos animais do Grupo II eram diferentes dos níveis observados nos animais do Grupo controle. Nas demais coletas sangüíneas, observou-se redução constante e progressiva da calcemia, mas sem diferença entre os grupos estudados. (Fig. 4D) Na Tabela 3, encontram-se sumarizados os valores de "p" para a contagem de leucócitos e para os parâmetros bioquímicos avaliados.

Tab. 3. Comparação dos grupos de animais em relação à contagem de leucócitos e aos parâmetros bioquímicos, com base no teste-t.

Variável	Coleta sangüínea (hora)	Grupo II *vs.* Grupo III	Grupo II *vs.* Grupo I	Grupo III *vs.* Grupo I
Leucócitos ($10^3/mm^3$)	0	0,2552	0,2342	0,9121
	6	0,0010	0,1589	0,0145
	12	0,4459	0,3208	0,8789
Glicose (mg/dl)	0	0,3140	0,0489	0,3825
	6	0,3217	0,0226	0,0583
	12	0,3618	0,0964	0,5913
Amilase (UI/l)	0	0,1434	0,5640	0,2714
	6	0,9928	0,0020	0,0028
	12	0,1217	0,0011	0,0044
Lípase (UI/l)	0	0,6369	0,4435	0,0313
	6	0,2664	<0,0001	0,0003
	12	0,9701	0,0005	0,0143
Cálcio (mg/dl)	0	0,0833	0,0034	0,4325
	6	0,4831	0,3727	0,1685
	12	0,3441	0,1286	0,5258

As figuras 5 e 6 ilustram o comportamento individual dos animais nos três momentos da coleta sangüínea. Os animais numerados de 1 a 10 pertencem ao Grupo I (Controle), os de 11 a 20 ao Grupo II e os de numeração de 21 a 30 correspondem aos do Grupo III. Observam-se, mais nitidamente, as diferenças referentes à leucometria, à amilasemia e à lipasemia.

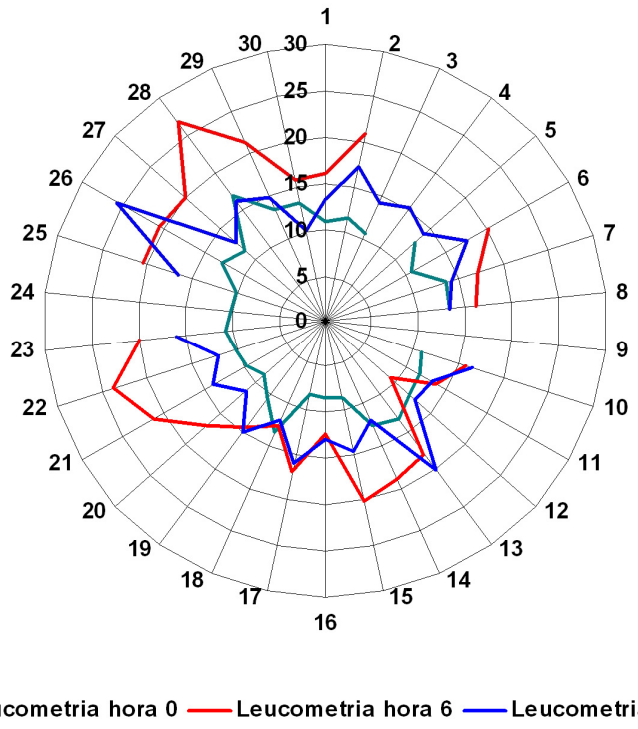


Fig. 5. Valores observados para a leucometria, em cada animal, nos três grupos de estudo, nos três diferentes momentos de coleta.

4.4 – CULTURA DE MICRORGANISMOS

Não ocorreu crescimento bacteriano aeróbico no líquido peritoneal e nos órgãos intra-abdominais analisados nos animais do Grupo controle.

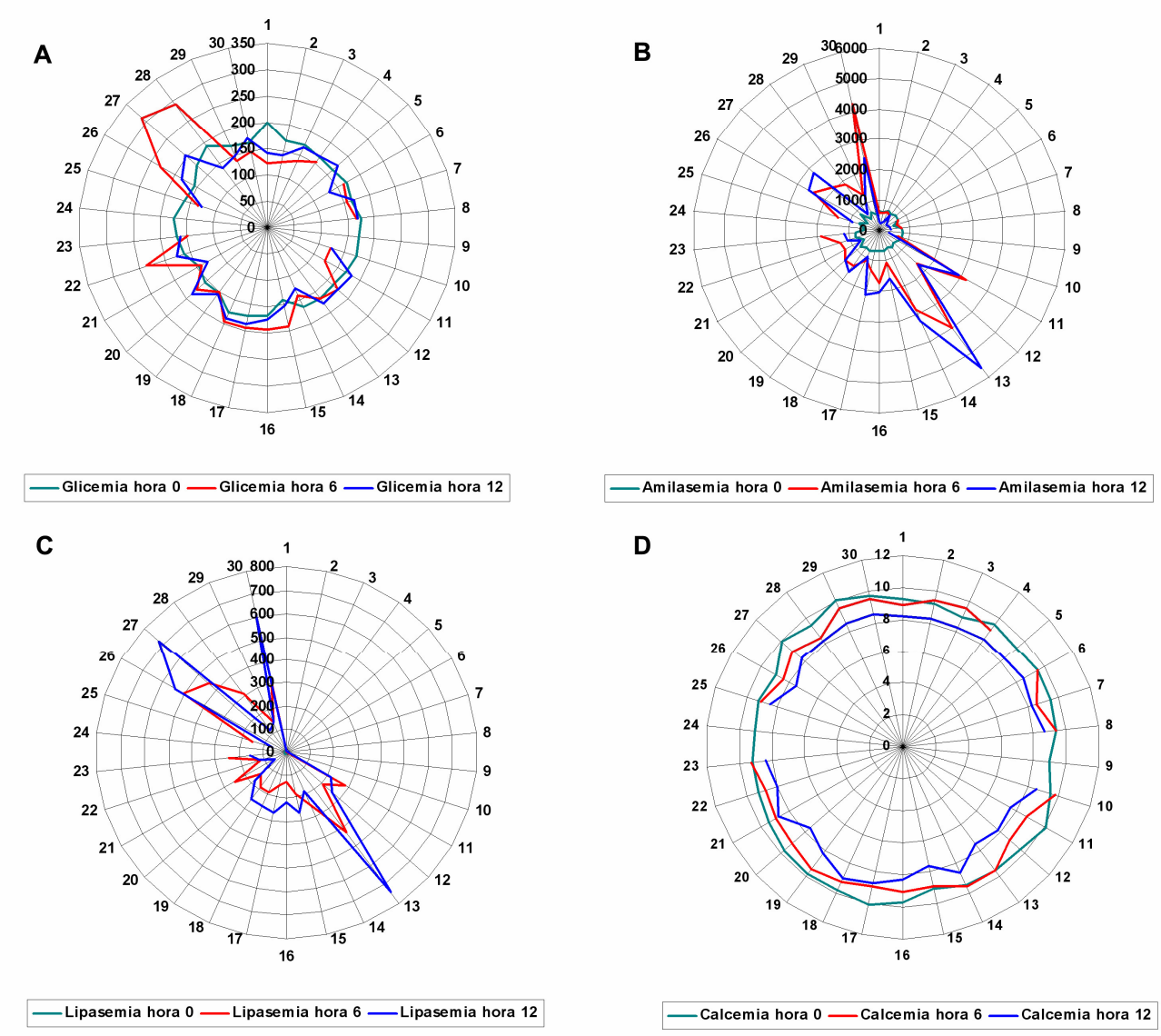


Fig. 6. Valores observados para os parâmetros bioquímicos, em cada animal, nos três grupos de estudo, nos três diferentes momentos de coleta.

Houve um número maior de culturas positivas para microrganismos aeróbicos nos animais do grupo em que se induziu a pancreatite aguda e recebeu bactérias probióticas (Grupo III), em comparação aos animais do grupo sem suplementação dietética (Grupo II). A proporção de animais com cultura positiva para microrganismos, em relação ao número de animais em cada grupo de estudo, encontra-se indicado na Tabela 4.

Tab. 4. Proporção de culturas positivas para microrganismos aeróbicos, em relação ao número de animais em cada grupo de estudo.

Grupos	Nº de culturas positivas / número total de animais
I	0 / 9
II	5 / 10
III	7 / 9

Analisando os tecidos que apresentaram culturas positivas, também se observou um maior comprometimento nos animais que receberam suplementação probiótica antes da indução da pancreatite. (Tab. 5) Os órgãos com maior ocorrência de colonização bacteriana nos animais do Grupo II foram pâncreas e fígado, enquanto nos animais do Grupo III foram pâncreas, fígado e baço.

Tab. 5. Proporção de tecidos com culturas positivas para microrganismos aeróbicos, em relação ao número de animais em cada grupo de estudo.

Grupos	Número de culturas positivas / número total de animais				
	LN	**LP**	**P**	**F**	**B**
I	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9
II	1 / 10	0 / 10	3 / 10	3 / 10	1 / 10
III	1 / 9	2 / 9	5 / 9	6 / 9	4 / 9

LN – Linfonodo mesentérico; LP – Líquido peritoneal; P – Pâncreas; F – Fígado; B – Baço

Foram isolados três tipos de bactérias aeróbicas potencialmente patogênicas: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Nos animais do Grupo III, somente foram encontradas bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), enquanto nos

animais do Grupo II foram encontradas bactérias gram-negativas e gram-positivas (*S. aureus*).

A tabela 6 resume os resultados da análise da colonização bacteriana, detalhando o tipo de bactéria e o local em que foi encontrada, em cada animal. Essa tabela ilustra que, no Grupo II, dos cinco animais com culturas positivas, foi isolada mais de uma espécie de bactéria em apenas um deles (rato 3). Nos animais do Grupo III, apesar da maior ocorrência de colonização bacteriana (sete em nove animais), em nenhum deles foi isolada mais de uma espécie de bactéria.

Analisando, entretanto, os tecidos colonizados, observou-se que, no Grupo II, dos cinco animais com culturas positivas, três apresentaram colonização bacteriana em apenas um local. Já no Grupo III, dos sete animais em que ocorreu crescimento bacteriano, apenas em um rato a colonização se restringiu a um local.

Tab. 6. Colonização bacteriana observada nos animais dos grupos II e III.

Grupo	Local	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
II	**Pâncreas**	rato 7	ratos 2 e 3	- - -
	Fígado	ratos 3 e 8	rato 2	- - -
	Baço	- - -	rato 3	- - -
	LN	- - -	- - -	rato 10
	LP	- - -	- - -	- - -
III	**Pâncreas**	rato 5	ratos 6, 7, 8 e 10	- - -
	Fígado	ratos 1 e 5	ratos 7, 8, 9 e 10	- - -
	Baço	ratos 1 e 5	ratos 7 e 8	- - -
	LN	rato 1	- - -	- - -
	LP	rato 1	rato 9	- - -

LN – Linfonodo mesentérico, LP – Líquido peritoneal

Apesar da maior colonização bacteriana nos animais do Grupo III, não houve diferença significativa entre os grupos, nem maior risco de

colonização quando se comparou o Grupo II com o Grupo III, como mostra a tabela 7.

Tab. 7. Comparação dos animais do Grupo II *vs.* Grupo III quanto ao risco de colonização bacteriana.

Local	Grupo II (n)	Grupo III (n)	Teste de Fisher (p)	RR Ajustado	OR ajustado
Pâncreas	3	5	0,3698	1,85 (0,61-5,63)	2,91 (0,44-19,23)
Fígado	3	6	0,1789	2,22 (0,77-6,37)	4,66 (0,67-32,36)
Baço	1	4	0,1409	4,44 (0,60-32,76)	7,2 (0,62-83,34)
LN	1	1	1	1,11 (0,08-15,28)	1,12 (0,06-21,08)
LP	0	2	0,2105	*	*

n – número de animais; LN – linfonodo mesentérico, LP – Líquido peritoneal; RR – risco relativo; OR – *odds ratio* (razão de chance)
* A estimativa do risco não pôde ser calculada devido à baixa ocorrência de colonização bacteriana nesse local.

4.5 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os animais apresentaram distensão gástrica intensa e freqüente, além da presença de líquido peritoneal serossangüinolento. Macroscopicamente, o pâncreas apresentava-se edemaciado e endurecido, com focos de necrose e hemorragia. Por vezes, essas lesões eram confluentes, caracterizando extensa destruição parenquimatosa. Na maioria dos ratos, foram observadas áreas de esteatonecrose no parênquima pancreático e nos mesentérios duodenal e jejunal proximal, caracterizando lesões conhecidas como “pingos de vela”. (Fig. 7)

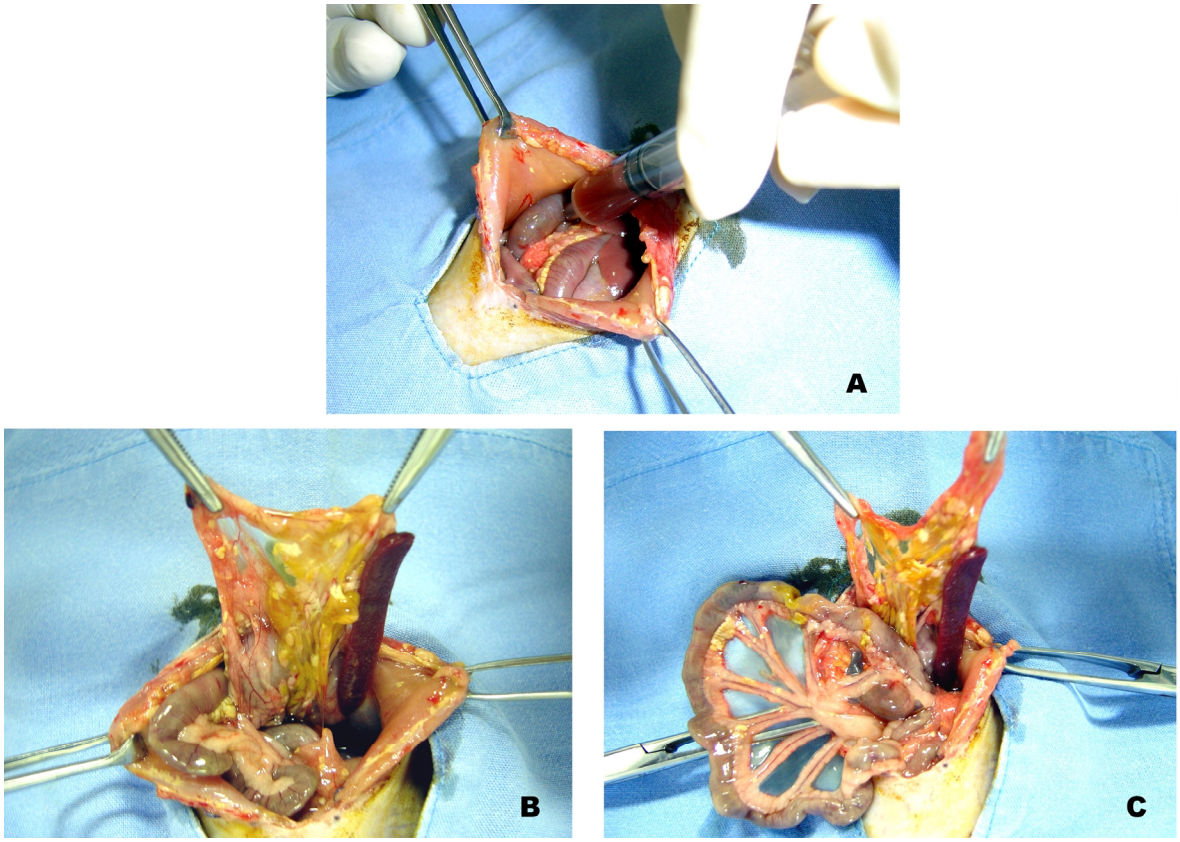


Fig. 7. Pancreatite aguda: A – líquido peritoneal sero-sangüinolento; B e C – aspecto macroscópico das alterações parenquimatosas e da esteatonecrose.

Pela avaliação microscópica, a glândula apresentava lesão degenerativa característica nos animais dos grupos em que a pancreatite foi induzida (grupos II e III), com presença de extensas alterações acinares, esteatonecrose, hemorragia e infiltrado leucocitário, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares. Contudo, embora extensas e por vezes confluentes, somente foram observadas lesões focais do pâncreas. Nos animais do Grupo controle, não foram observadas alterações histológicas, sendo mantida a arquitetura pancreática normal.

A tabela 8 apresenta os resultados da análise histopatológica. A figura 8 ilustra o aspecto microscópico das alterações pancreáticas observadas nos animais dos grupos II e III, em comparação aos animais do Grupo I, sob magnificação da imagem em 20 X.

Tab. 8. Análise histopatológica do tecido pancreático nos animais dos grupos II e III.

Grupo	Animal	Esteatonecrose	Lesão acinar	Hemorragia	Inf. leucoc.	Total
II	**1**	2	1	0	1	4
	2	1	1	1	1	4
	3	2	3	1	3	9
	4	1	3	1	1	6
	5	1	3	1	2	7
	6	0	1	0	1	2
	7	0	1	1	1	3
	8	1	3	1	2	7
	9	1	1	1	2	5
	10	0	1	1	2	4
	Média	**0,9**	**1,8**	**0,8**	**1,6**	**5,1**
III	**1**	2	2	1	3	8
	2	1	1	0	0	2
	3	3	2	1	2	8
	5	2	3	1	2	8
	6	1	1	2	3	7
	7	1	3	2	2	8
	8	3	2	1	3	9
	9	1	2	0	1	4
	10	1	2	1	2	6
	Média	**1,6**	**2**	**1**	**2**	**6,6**

Inf. leucoc. – infiltrado leucocitário

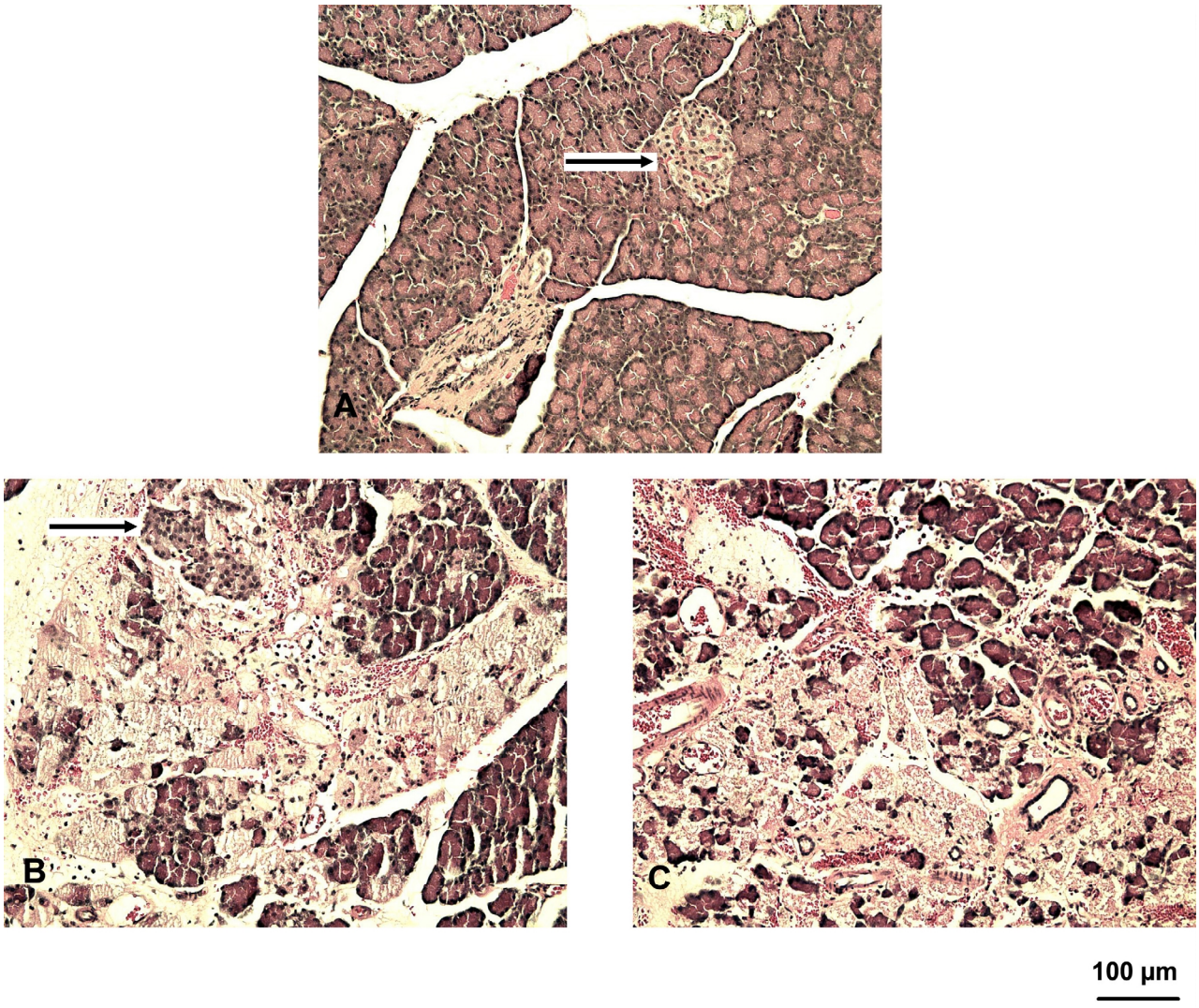


Fig. 8. Fotomicrografias do tecido pancreático nos animais dos diversos grupos de estudo: A – Grupo I, pâncreas normal; B e C – grupos II e III, respectivamente – extensas lesões acinares, com áreas de hemorragia e de infiltrado leucocitário polimorfonuclear, em meio a tecido pancreático normal. Em A e B, identificam-se células de ilhotas pancreáticas (setas). Barra = 100 µm

5 – DISCUSSÃO

Desde que Herophilus, considerado o “Pai da Anatomia”, descreveu o pâncreas pela primeira vez (cerca de 300 a.C.), até 1889, quando Reginald Heber Fitz, um patologista da Universidade de Harvard – EUA, relatou os sinais e sintomas da pancreatite aguda e a sua variada evolução – necrose, hemorragia e supuração – pouco se tem registrado sobre esse enigmático órgão.[52,53] Alguns anos após a publicação do trabalho de Fitz, Chiari (1896) postulou que o mecanismo fisiopatológico da doença envolvia a autodigestão da glândula, hipótese ratificada por Opie, em 1901, ao propor a teoria do “canal comum” (*apud* O’Reilly & Kingsnorth, 2001).[54] A hipótese de Opie perdurou por longo tempo, até que se demonstrasse que a obstrução do ducto pancreático, sem envolvimento do ducto biliar, também causava pancreatite necrotizante.[55] Até os nossos dias, apesar do avanço no conhecimento acerca de seus fatores de risco e da grande morbi-mortalidade dela decorrente, a fisiopatologia da PA permanece incompreendida, em muitos de seus aspectos.

Inúmeras são as etiologias conhecidas para a PA, mas a sua real incidência é extremamente variada e difícil de ser corretamente avaliada. Em aproximadamente 45% dos casos essa enfermidade está associada a litíase biliar, em cerca de 35% dos pacientes com o consumo abusivo de álcool e, em 10% dos casos, a causa não pode ser determinada.[14,56] A elevação do número de novos casos que tem sido observada em alguns países pode ser atribuída não somente ao aumento do consumo de álcool, mas também à maior disponibilização de métodos de diagnóstico, sobretudo radiológicos.[7,11,57]

A despeito da evolução dos conhecimentos acerca do pâncreas e de suas enfermidades, pouco se avançou no campo da terapêutica e, assim, a PA ainda não

possui tratamento específico. Essa enfermidade, uma vez desencadeada, apresenta curso imprevisível e a identificação precoce dos pacientes que apresentam maior susceptibilidade para uma evolução desfavorável tem motivado o desenvolvimento de inúmeras pesquisas.[58] Dentre os muitos aspectos que vêm sendo pesquisados, destacam-se as medidas profiláticas da infecção secundária da necrose pancreática, como, p. ex, a prevenção da translocação bacteriana. Acredita-se, assim, que as complicações sépticas que constituem a causa primária da mortalidade na forma grave da doença poderiam ser minimizadas com o controle da translocação de bactérias provenientes do lúmen intestinal.[7,28]

O momento ideal para a instituição dessa eventual medida profilática também tem sido objeto de pesquisa. Bengmark (2004), em experimentos com indução de PA, sugeriu a existência de uma "janela terapêutica" de não mais que 24 a 36 horas para o início do tratamento, mostrando que, após esse período, o efeito de um eventual tratamento possivelmente surtiria efeito mais restrito. O mesmo autor argumentou que esse conceito talvez pudesse explicar o limitado benefício clínico observado com o início tardio de tratamento em pacientes acometidos por PA grave. Melhores resultados, provavelmente, poderiam ser obtidos caso o tratamento fosse instituído antes, ou, se não factível, o mais precocemente possível, no início do processo agudo da doença.[59] Essa observação motivou a realização da suplementação dietética com bactérias probióticas em animais saudáveis, antes da indução experimental da PA.

O método dietético mais freqüentemente utilizado para alterar a composição da flora intestinal consiste no uso de probióticos.[60] Porém, grande diversificação existe no seu emprego, tanto no que se refere à forma com que são apresentados (p. ex, preparações liofilizadas, cápsulas, ou suplementos alimentares, como iogurte

e suco de frutas) quanto no que se refere a doses e tempo de administração,[47,61-64] dificultando a padronização dos resultados.

Optou-se por utilizar 1,2 x 10^9 UFC de bactérias probióticas por animal, pois, em geral, a dose recomendada situa-se em torno de 10^9-10^{11} UFC, independentemente da via de administração.[65] Além disso, nosso intuito era atuar de forma preventiva, na expectativa que essa suplementação trouxesse algum benefício clínico por ocasião da indução da PA. Conquanto a segurança dos produtos atualmente utilizados seja considerada excelente, por se constituírem em microrganismos vivos, alguns dos efeitos colaterais que podem advir, em indivíduos susceptíveis, são: infecção, atividade metabólica deletéria (p. ex., desconjugação de sais biliares, causando diarréia), estimulação imunológica excessiva e transferência de genes para a flora endógena.[40] Assim, não se considerou conveniente utilizar concentrações mais elevadas de bactérias probióticas pela possibilidade de propiciarem o surgimento de efeitos colaterais indesejáveis.

Casos de infecção por lactobacilos e bifidobactérias são raros, mas há muito vêm sendo identificados,[66,67] como, p. ex., relatos de bacteremia e endocardite causados por *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. leichmanii*.[68] O fato de as espécies de lactobacilos não serem habitualmente reconhecidas como patógenos e o uso rotineiro de antibióticos podem ser considerados alguns dos fatores de risco para o aparecimento de lactobacilemia.[69] Similarmente, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, p. ex., deixaram de ser utilizados como probióticos por propiciarem o desenvolvimento de resistência a antibióticos, aumentando a chance de se tornarem patógenos oportunistas.[70] Também pode ocorrer a translocação de bactérias benéficas, como exemplificado pelo relato de infecção da necrose pancreática causada por uma bactéria

relativamente sem virulência (*Lactobacillus paracasei*) em um paciente imunocompetente que desenvolveu quadro de pancreatite aguda biliar grave.[71]

Também existe controvérsia quanto a espécie e a cepa de probióticos a serem suplementadas. Como os efeitos exercidos pelos probióticos são cepa-específicos, possivelmente não existe uma cepa que possua todas as propriedades desejadas. Assim, alguns pesquisadores recomendam uma preparação com multi-cepas, ao invés da utilização de uma cepa isolada.[28,72] Essa escolha também deve levar em consideração a capacidade do microrganismo em sobreviver aos baixos valores do pH gástrico, a sua tolerância aos ácidos biliares presentes no duodeno, o seu potencial de adesão à mucosa intestinal, a sua taxa de crescimento e a sua atividade antimicrobiana.[73-77]

Neste trabalho, optou-se pela utilização de multi-espécies e de multi-cepas de probióticos com atividade na imunidade inata, a primeira linha de defesa do hospedeiro. Por meio de interações com as células imunes ou com receptores celulares, esses probióticos aumentam a atividade fagocitária dos leucócitos e, dessa, forma atuam no combate a infecções.[35,78] Adicionalmente, os probióticos utilizados mostram habilidade não somente de sobreviver às condições adversas do trato digestório superior, mas também de aderir e colonizar a mucosa das porções mais distais do intestino.[40,79-82]

Inúmeros modelos de indução de PA foram descritos na literatura.[83-85] Geralmente, os modelos são classificados como invasivos e não-invasivos, indicando a necessidade ou não de manipulação cirúrgica para indução da pancreatite. Essa classificação, entretanto, não engloba a gravidade da doença.[86] Utilizou-se o modelo de inoculação de taurocolato de sódio a 5% no ducto biliopancreático, por se constituir em uma técnica simples, efetiva e rápida e que é

compatível com o desenvolvimento de uma pancreatite aguda grave.[87,88] A inoculação dessa substância determina a ocorrência de lesão necrótica progressiva nas células acinares, ductais e vasculares, iniciadas pela ação detergente do sal biliar. As alterações histopatológicas dela advindas surgem precocemente, em áreas relativamente extensas, em meio a parênquima pancreático relativamente normal, mas não chegam a abranger todo o órgão, mesmo com o passar do tempo.[89] Nossos resultados estão de acordo com o relato original de Aho *et al* (1980)[89] e, mesmo após 12 horas, observou-se somente áreas focais de lesão, por vezes extensas e confluentes, e elevada quantidade de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares na região perivascular, caracterizando grave dano ao órgão.

Uma das eventuais críticas a esse método refere-se à pressão empregada para a infusão do ácido biliar no ducto biliopancreático, haja vista que a gravidade da lesão pode ser alterada por variações tanto na pressão quanto na concentração do sal biliar usado.[83,90] Para contornar essa eventual limitação da técnica, criou-se uma câmara gasosa no interior da seringa, no intuito de minimizar e manter relativamente constante a pressão de infusão do ácido biliar.

A elevada mortalidade inerente a esse modelo deve-se à reação do sistema imune ao dano celular inicial, sendo tão mais intensa quanto mais elevada a concentração utilizada do ácido biliar.[84] Mikami *et al* (2002), com o emprego dessa mesma técnica, com concentrações diferentes de taurocolato de sódio, mostraram que a sobrevida de ratos *Wistar* foi inversamente proporcional à gravidade da pancreatite aguda induzida, diminuindo marcadamente dentro de 12 a 36 horas após a sua indução.[88]

Como a translocação bacteriana, responsável potencial pela infecção da necrose pancreática, é um fenômeno freqüente e que ocorre nas fases iniciais da

pancreatite aguda,[23,60] optou-se por coletar amostras sangüíneas e material para análise microbiológica dentro de um intervalo de 12 horas após a indução da pancreatite.

Os animais do Grupo controle foram submetidos a operação simulada, de modo a que pudessem ser empregados como padrão de comportamento dos parâmetros bioquímicos, da contagem leucocitária e da colonização bacteriana nos tecidos corporais submetidos a exame microbiológico.

Habitualmente, em humanos com pancreatite aguda, os níveis séricos das enzimas pancreáticas (lipase e amilase) elevam-se acima de três vezes o seu limite superior de referência, permanecendo elevados com o desenvolver da doença, mas, freqüentemente, a amilasemia retorna ao seu valor normal antes da lipasemia.[91-93] Observou-se aumento importante dos níveis das enzimas pancreáticas, em ambos os grupos de animais em que a pancreatite foi induzida. Comparando-se com o Grupo controle, nos animais dos grupos II e III observou-se aumento de aproximadamente três vezes o valor médio inicial (hora 0) da amilasemia e de 60 vezes o valor médio inicial da lipasemia, o que permitiu a caracterização de um quadro franco de pancreatite aguda, em concordância com os achados de outros autores.[94-96]

Na evolução de um quadro de PA, a avaliação laboratorial é considerada complementar à avaliação clínica, com a elevação dos níveis séricos de glicose e da contagem leucocitária, além da redução da calcemia, constituindo-se em fatores associados a um prognóstico ruim.[7,97] O risco dessa ocorrência reside no fato de que, com a progressão do processo inflamatório, pode ocorrer extravasamento de líquido intravascular e albumina para a cavidade peritoneal. Como o cálcio sérico é transportado ligado à albumina, poderá ocorrer uma redução em seus níveis

plasmáticos.[98] No tocante à glicemia, a persistência de normalidade dos níveis séricos de glicose na pancretatite aguda é considerada um bom fator prognóstico, pois a ocorrência de hiperglicemia, em pacientes não-diabéticos, pode predizer uma complicaçào da doença, com dano e disfunção das células das ilhotas de Langerhans e com importante aumento da morbidade.[99,100]

Nossos dados sugerem que a suplementação dietética com bactérias probióticas não foi capaz de modificar a evolução desfavorável desses dois marcadores de gravidade (cálcio e glicose). Embora não se tenha encontrado diferença significativa em nenhuma das coletas sangüíneas, a redução do cálcio sérico nos animais dos grupos II e III foi mais intensa do que a que ocorreu nos animais do Grupo controle. Da mesma forma, os animais do Grupo III apresentaram níveis glicêmicos mais elevados do que os animais dos grupos I e II, embora também sem significância estatística.

Um resultado singular a ser ressaltado foi a menor elevação da leucometria nos animais do Grupo II (que não receberam suplementação dietética com bactérias probióticas) em comparação aos animais do Grupo III. A possibilidade de estimulação imunológica excessiva, como complicação da suplementação dietética com as cepas de probióticos utilizadas, não pode ser descartada. Entretanto, a elevação mais substancial da leucometria nos animais do Grupo III não se acompanhou de uma evolução mais deletéria nesses animais, a julgar pelo estudo histopatológico do pâncreas e pelo índice de colonização bacteriana dos tecidos analisados.

Na PA induzida por taurocolato de sódio, a infecção pancreática é um achado comum que pode ocorrer, aproximadamente, entre oito e 16 horas após o início do quadro e, comumente, as bactérias identificadas em culturas de tecido pancreático

sugerem que a fonte de contaminação seja o intestino grosso ou o íleo terminal.[101] A presença de bactérias em tecidos extra-intestinais estéreis consiste em um método amplamente aceito para a confirmação da translocação bacteriana conseqüente à disfunção da barreira intestinal.[102] Corroborado pelos achados bacteriológicos de experimentos similares,[17,103] detectou-se infecção freqüente de órgãos extra-intestinais, incluindo o pâncreas, 12 horas após a indução de PA.

Apesar de se constituir em tema controverso,[31,104] a provável explicação para essa ocorrência encontra-se no aumento da permeabilidade intestinal, caracterizada pela mudança nas junções intercelulares e na apoptose dos enterócitos.[105] Esse aumento da permeabilidade é causado pela alteração hemodinâmica, local e sistêmica, conseqüente à importante perda de volume plasmático circulante e à excessiva liberação de mediadores inflamatórios.[106-108]

Associado ao aumento da permeabilidade intestinal, parece ser comum a presença de um supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SBID) na PA.[109,110] No intestino intacto, a SBID é prevenida pela ação do suco gástrico, pela atividade das enzimas pancreáticas, pela motilidade intestinal e pela válvula ileocecal.[111] Ao que parece, na PA, a ruptura do complexo migratório mioelétrico (padrão motor intestinal no período interdigestivo) é o principal fator que leva ao desenvolvimento da SBID.[112,113]

A microbiologia da sepse pancreática, em seres humanos, está bem caracterizada e reflete a flora gastrointestinal comum.[114] Os microrganismos freqüentemente isolados são: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Staphilococcus* e *Candida,* dentre outros. Entretanto, pode haver variação do tipo de bactéria isolada na necrose pancreática, dependendo da etiologia da pancreatite. As bactérias gram-negativas são mais comuns na

pancreatite biliar, enquanto que as bactérias gram-positivas são mais comuns na pancreatite alcoólica.[115] Nossos achados apresentam similaridade com o padrão da necrose pancreática infectada habitualmente prevalente em seres humanos. Não se identificou outra bactéria, além das pertencentes à flora normal, nas culturas realizadas nos tecidos pancreático e extra-pancreáticos. O espectro de bactérias encontradas consistiu, primariamente, de bastonetes gram-negativos (*E. coli* e *P aeruginosa*), mas também incluiu o *S. aureus* (gram-positivo).

Apesar da análise estatística não ter evidenciado maior risco de colonização nos animais de nenhum grupo, é importante se ressaltar que ocorreu diferença no padrão observado nos grupos II e III. Nos ratos do Grupo II, as culturas identificaram a presença de bactérias gram-negativas e gram-positiva, enquanto que as bactérias encontradas nos animais do Grupo III foram todas gram-negativas. Todavia, no que se refere ao número de órgãos colonizados, notou-se que na maioria dos animais do Grupo III com cultura positiva, a colonização acometeu mais de um local.

Quando o termo translocação bacteriana foi empregado pela primeira vez,[24] fazia-se menção à passagem de bactérias do trato digestório para outros tecidos através da lâmina própria, em direção aos linfonodos mesentéricos. A partir desse local, as bactérias alcançariam órgãos distantes e sinalizariam para o desencadeamento do processo inflamatório sistêmico. Entretanto, observou-se que a presença de bactérias no linfonodo mesentérico poderia refletir uma função normal do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), necessária para a geração de células imunocompetentes.[116] Portanto, quando ocorre colonização bacteriana no linfonodo mesentérico, ela poderá estar associada à redução da eliminação de bactérias, e não, necessariamente, ao aumento da sua penetração transepitelial.[27]

Essa pode se constituir na justificativa para a baixa incidência de colonização bacteriana no linfonodo mesentérico dos animais deste estudo.

Similarmente, o mecanismo exato pelo qual as bactérias alcançam o pâncreas e a necrose peripancreática ainda não está esclarecido. Acredita-se que as bactérias intestinais alcancem outros locais por rotas distintas, tais como a sangüínea, a transmural (migração através da parede intestinal), a linfática, via líquido peritoneal,[17,23,117,118] ou mesmo por fagocitose.[116] Essas observações foram confirmadas pela análise microbiológica dos tecidos coletados, pois os principais órgãos com cultura positiva foram baço, fígado e pâncreas. Em contraposição, os locais com menor índice de colonização bacteriana foram o linfonodo mesentérico e o líquido peritoneal. Nossos achados poderiam atestar que, preferencialmente, as bactérias tenham utilizado outra via, que não a linfática, para atingir outros tecidos.

Mangiante *et al* (2001) utilizaram a suplementação dietética com uma alta concentração de uma cepa de lactobacilos (*L. plantarum* 299v), quatro dias antes e quatro dias após a indução da PA (5 ml/dia de uma suspensão com 0,5-1,0 x 10^9 UFC/ml) e relataram sucesso na redução da translocação bacteriana.[119] Esses autores somente realizaram culturas no sangue, no linfonodo mesentérico e no pâncreas. Sua conclusão foi a de que a administração profilática de lactobacilos protegeu as células da mucosa intestinal e, de certa forma, limitou as complicações e seqüelas advindas da PA, aludindo que isso poderia trazer algum impacto no aumento da sobrevida, porém isso não foi avaliado. Nas culturas realizadas no nosso estudo, pôde-se observar que nem todos os animais apresentaram o mesmo padrão de colonização e que a grande diversidade de órgãos coletados permitiu uma verificação mais fidedigna da ausência ou da presença de translocação bacteriana.

Também em humanos vem-se tentando prevenir a ocorrência de infecção pela suplementação dietética com probióticos e simbióticos, mas os poucos estudos existentes falharam em demonstrar que eles pudessem se constituir em uma alternativa promissora aos antibióticos. Com o objetivo de avaliar o efeito de probióticos e de simbióticos na incidência de translocação bacteriana, de colonização gástrica e de complicações sépticas, foram realizados estudos em pacientes no período pré-operatório para operações eletivas.[46,102,120] Um dos estudos utilizou o *L. plantarum* (diluído em 500 ml, a uma concentração de 5 x10^7 UFC/ml), enquanto em outro utilizou-se uma combinação de oligofrutose (prebiótico) e uma mistura de várias cepas probióticas (*L acidophilus*, *L bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis*, e *Streptococcus thermophilus*), a uma concentração de 4 x 10^9 UFC, mas, em ambos os casos, os autores concluíram que não houve benefício para os pacientes, no que se refere às variáveis avaliadas. Em um terceiro estudo, em que se avaliou a ação do *L. plantarum* na função do GALT, em pacientes em preparo para tratamento cirúrgico eletivo, mostrou-se a ausência de aumento significativo na concentração de IgA e IgM na mucosa intestinal, diferindo do que é habitualmente observado em animais, com o uso desse probiótico.[46]

Acredita-se que grande parte das doenças que acometem o ser humano esteja associada ao estilo de vida. O estresse da vida moderna, o sedentarismo e a alimentação deficitária tornam os indivíduos menos resistentes e favorecem o aparecimento de muitas doenças infecciosas e degenerativas. As principais mudanças alimentares observadas nas últimas décadas que vêm contribuindo negativamente para a saúde do homem são o aumento no consumo de produtos de origem animal, de açúcares e de gorduras.[121,122] Esse tipo de alimentação contribui

para o desenvolvimento da disbiose, por dificultar a sobrevivência de bactérias benéficas em detrimento da proliferação de bactérias potencialmente patogênicas.[123]

Em experimento com animais, Wu *et al* (1998) demonstraram que a disbiose favorece a translocação bacteriana na PA.[124] Esses autores procederam à colonização de animais com uma cepa de *E. coli* resistente a ampicilina, antes da indução da PA. Sete dias após, verificaram que, nos animais do grupo-intervenção, a quantidade de *E. coli* no lúmen e na mucosa intestinais era consideravelmente maior do que a encontrada nos animais do Grupo controle, sem indução de PA. Além disso, a cultura dessa bactéria foi positiva nos órgãos (linfonodo mesentérico, pâncreas, fígado, pulmão, rim e baço) de todos os animais em que a PA foi induzida, em contraposição ao achado de apenas duas culturas positivas no linfonodo mesentérico dos animais do Grupo controle.

A suplementação dietética com bactérias probióticas antes da indução da PA, com as cepas utilizadas neste experimento, pode ter falhado em mostrar efeitos mais satisfatórios, por três razões principais: (1) pela utilização de uma concentração insatisfatória de bactérias probióticas; (2) pelas cepas de probióticos utilizadas, que, eventualmente, poderiam não se constituir nas mais adequadas para a prevenção da translocação bacteriana; e (3) pelo fato de os animais, ocasionalmente, não apresentarem alterações na microecologia instestinal – disbiose.

A continuação desta linha de pesquisa se faz necessária, no sentido de serem testadas outras cepas de probióticos, em concentrações distintas e em outros modelos animais com padrões diferentes de microflora intestinal, para a determinação inequívoca do papel dos probióticos na resposta e na sobrevida a pancreatite aguda grave induzida em ratos.

6 – CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho sugerem que a suplementação dietética com *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* antes da indução de pancreatite aguda em ratos:

- não altera as dosagens de alguns marcadores bioquímicos de gravidade da pancreatite aguda (glicemia e calcemia);

- promove elevação significativa inicial na contagem leucocitária;

- reduz as elevações da lipasemia e da amilasemia dos animais, ainda que sem significância;

- não previne a translocação bacteriana.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira PR. Pancreatites: definição e classificação. In: Alves JG, editor. Temas de Atualização em Gastroenterologia. Rio de Janeiro: Eldebra; 2003. p. 267-78.
2. United Kingdom guidelines for the management of acute pancreatitis. British Society of Gastroenterology. Gut. 1998;42(Suppl. 2):1S-13S.
3. Abou-Assi S, O'Keefe SJ. Nutrition support during acute pancreatitis. Nutrition. 2002;18:938-43.
4. Baker S. Diagnosis and management of acute pancreatitis. Crit Care Resusc. 2004;6:17-27.
5. Dervenis C. Enteral nutrition in severe acute pancreatitis: future developement. JOP. 2004;5:60-3.
6. Radenkovic D, Johnson CD. Nutritional support in acute pancreatitis. Nutr Clin Care. 2004;7:98-103.
7. 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.
8. Kaushik N, O´Keefe SJ. Nutritional support in acute pancreatitis. Curr Gastroenterol Rep. 2004;6:320-6.
9. Roberts PR. Nutritional support in acute pancreatitis: an update on management issues. Semin Respir Crit Care Med. 2001;22:29-34.
10. Abou-Assi S, O'Keefe SJ. Nutrition in acute pancreatitis. J Clin Gastroenterol. 2001;32:203-9.
11. 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.

12. Clancy TE, Benoit EP, Ashley SW. Current management of acute pancreatitis. J Gastrointest Surg. 2005;9:440-52.
13. Marik PE, Zaloga GP. Meta-analysis of parenteral nutrition versus enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. BMJ. 2004;328:1407-12.
14. Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, *et al*. JPN guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2006;13:10-24.
15. Norman, J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. Am J Surg. 1998;175:76-83.
16. Yamauchi JI, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, *et al*. Cytokine modulation in acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2001;8:195-203.
17. Isaji S, Mizuno S, Tabata M, Yamagiwa K, Yokoi H, Uemoto S. Bacterial analysis of infected pancreatic necrosis and its prevention (Symposium 8: Pancreatobilyary Infection (IHPBA)). J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2003;10:419-24.
18. Levy J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. Am J Gastroenterol. 2000;95(Suppl):S8-S10.
19. Qamruddin AO, Chadwick PR. Preventing pancreatic infection in acute pancreatitis. J Hosp Infect. 2000;44:245-53.
20. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis int' Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol. 1998;41:85-101.

21. Lupp C, Finlay BB. Intestinal microbiota. Curr Biol. 2005;15:235-6.
22. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am J Clin Nutr. 1999;69(Suppl):1052S-7S.
23. Berger HG, Bittner R, Block S, Büchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. Gastroenterology. 1986;91:433-8.
24. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnobiotic mouse model. Infect Immun. 1979;23:403-11.
25. Steinberg SM. Bacterial translocation: what it is and what it is not. Am J Surg 2003;186:301-5.
26. Berg RD. Translocation of enteric bacteria in health and disease. Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1992;59:44-65.
27. Wiest R, Rath HC. Bacterial translocation in the gut. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;17:397-425.
28. Besselink MG, Timmerman HM, van Minnem LP, Akkermans LM, Gooszen HG. Prevention on infectious complications in surgical patients: potential role of probiotics. Dig Surg. 2005;22:234-44.
29. Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2003;10:415-8.
30. Windsor AC, Kanwar S, Li AG, Barnes E, Guthrie JA, Spark JI, *et al*. Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute

phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. Gut. 1998;42:431-5.

31. Kanwar S, Windsor AC, Welsh F, Barclay R, Guillou PJ, Reynolds JV. Lack of correlation between failure of gut barrier function and septic complications after major upper gastrointestinal surgery. Ann Surg. 2000;231:88-95.
32. Quera RP, Quigley EM, Madrid AM. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal. Rev Med Chile. 2005;133:1361-70.
33. Alverdy J, Holbrook C, Rocha F, Seiden L, Licheng R, Musch M, *et al*. Gut derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host. Ann Surg. 2000;232:480-9.
34. Alverdy JC, Laughlin RS, Wu L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: Gut-derived sepsis redefined. Crit Care Med. 2003;31:598-607.
35. Gill HS. Probiotic to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best Pact Res Clin Gastroenterol. 2003;17:755-73.
36. Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. Altern Med Rev. 2003;8:143-55.
37. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 2005;307:1915-20.
38. McNaught CE, MacFie J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. Nutr Res. 2001;21:343-53.
39. Schrezenmeir J, Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. Am J Clin Nutr. 2001;73(Suppl):361S-4S.

40. 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.

41. Borges VC. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg DL, editor. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 1495-509

42. Bengmark S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. Best Pact Res Clin Gastroenterol. 2003;17:833-48.

43. Fioramonti J; Theodorou V, Bueno L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;17:711-24.

44. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002. Am J Clin Nutr. 2003;78:675-83.

45. Floch MH, Madsen KK, Jenkins DJ, Guandalini S, Katz JA, Onderdonk A, *et al*. Recommendations for probiotic use. J Clin Gastroenterol. 2006;40:275-8.

46. Woodcock NP, McNaught CE, Morgan DR, Gregg KL, MacFie J. An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients. Clin Nutr. 2004;23:1069-73.

47. McNaught CE, Woodcock NP, Anderson AD, MacFie J. A prospective randomized trial of probiotics in critically ill patients. Clin Nutr. 2005;24:21-9.

48. Suassuna I, Suassuna IR. Duplo açúcar uréia (DAU). Um meio de triagem para enterobactérias. Nota técnica. Rev Bras Patol Clin. 1978;14:201-3.

49. SAS Institute Inc. SAS Statistical Package®. CD-ROM, version 9.1 for Windows. Cary, NC, USA; 2002-2003.

50. Petroianu A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. Acta Cir Bras. 1996;11:157-64.

51. Marques RG, Miranda ML, Caetano CE, Biondo-Simões ML. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. Acta Cir Bras. 2005;20:262-7.

52. Busnardo AC, DiDio LJ, Tidrick RT, Thomford NR. Hystory of the pancreas. Am J Surg. 1983;146:539-50.

53. Leach SD, Gorelick FS, Modlin IM. Acute pancreatitis at its centenary. The contribution of Reginald Fitz. Ann Surg. 1990;212:109-13.

54. O'Reilly DA, Kingsnorth AN. A brief history of pancreatitis. J R Soc Med. 2001;94:130-2.

55. Lerch MM, Saluja AK, Rünzi M, Dawra R, Saluja M, Steer ML. Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. Gastroenterology. 1993;104:853-61.

56. Mitchell RM, Byme MF, Baillie J. Pancreatitis. Lancet. 2003;361:1447-55.

57. Perez-Mateo M. How we predict the etiology of acute pancreatitis. JOP. 2006;7:257-61.

58. Miranda F. Pancreatite aguda: diagnóstico. In: Alves JG, editor. Temas de Atualização em Gastroenterologia. Rio de Janeiro: Eldebra; 2003. p. 309-20.

59. Bengmark S. Synbiotics to strengthen gut barrier function and reduce morbidity in critically ill patients. Clin Nutr. 2004;23:441-5.

60. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, *et al*. Passclaim – gut health and immunity. Eur J Nutr. 2004;43(Suppl. 2):II/118-II/73.

61. Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglan A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. Eur J Clin Nutr. 2006; 60:464-8.
62. Adawi D, Ahrné S, Molin G. Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. Int J Food Microbiol. 2001;70:213-20.
63. Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. J Alergy Clin Immunol. 2002;109:119-21.
64. Dock DB, Latorraca MQ, Aguilar-Nascimento JE, Gomes-da-Silva MG. Probiotics enhance recovery from malnutrition and lessen colonic mucosal atrophy after short-term fasting in rats. Nutrition. 2004;20:473-6.
65. Mombeli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. Int J Antimicrob Agents. 2000;16:531-6.
66. Fedorak R, Madsen KL. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. Curr Opin Gastroenterol. 2004;20:146-55.
67. Coelho de Souza DF, Ferreira CL, Coelho de Souza AV, Brunoro Costa NM, Ybarra LM, Azevedo EM. Translocação de *Lactobacilus acidophilus* em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico suplementada com probiótico. Cienc Tecnol Aliment. 2004;24:522-6.
68. Bayer AS, Chow AW, Betts D, Guze LB. Lactobacillemia – Report of nine cases. Important clinical and therapeutic considerations. Am J Med. 1978;64:808-13.
69. Patel R, Cockerill FR, Porayko MK, Osmon DR, Ilstrup DM, Keating MR. Lactobacillemia in liver transplant patients. Clin Infect Dis. 1994;18:207-12.

70. Brashears MM, Amezquita A, Jaromi D. Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. Adv Food Nutr Res. 2005; 50:1-31.
71. 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.
72. 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.
73. Johansson ML, Molin G, Jeppsson B, Nobaek S, Ahrne S, Bengmark S. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect oh the indigenous flora. Appl Environ Microbiol. 1993;59:15-20.
74. Gismondo MR, Drago L, Lombardi A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. Int J Antimicrob Agents. 1999;12:287-92.
75. Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. Annu Rev Nutr. 2002;22:107-38.
76. Servin AL, Coconnier M-H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;17:741-54.
77. Taranto MP, Perez-Martinez G, Font de Valdez G. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Res Microbiol. 2006. *In Press*.
78. Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. Nutr Rev. 2003;61:91-9.

79. Nighswonger BD, Brashears MM, Gilliland SE. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. J Dairy Sci. 1996;79:212-9.

80. Yuki N, Watanabe K, Mike A, Tagami Y, Tanaka R, Ohwaki M, *et al*. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. Int J Food Mocrobiol. 1999;48:51-7.

81. Fernandez MF, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 2003;94:449-55.

82. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. Am J Clin Nutr. 2001;73(Suppl):399S-405S.

83. Steer ML. Workshop on experimental pancreatitis. Dig Dis Sci. 1985;30:575-81.

84. 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.

85. 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.

86. Lerch MM, Adler G. Experimental animal models of acute pancreatitis. Int J Pancreatol. 1994;15:159-70.

87. Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. Scand J Gastroenterol. 1980;15:411-6.

88. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, Qui-Feng H, Egawa S, Sunamura M. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. Surgery. 2002;132:86-92.

89. Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. Scand J Gastroenterol. 1980;15:417-24.

90. Lichtenstein A, Milani R Jr, Fernezlian SM, Leme AS, Capelozzi VL, Martins, MA. Acute lung injury in two experimental models of acute pancreatitis: infusion of saline or sodium taurocholate into the pancreatic duct. Crit Care Med. 2000;28:1497-502.

91. Pacheco RC, Nishioka SA, Oliveira LC. Validade da amilasemia e da lipasemia no diagnóstico diferencial entre pancreatite aguda/crônica agudizada e outras causas de dor abdominal aguda. Arq Gastroenterol. 2003;40:233-8.

92. Al-Bahrani AZ, Ammori BJ. Clinical assessment of acute pancreatitis. Clin Chim Acta. 2005;362:26-48.

93. Whitcomb DC. Clinical practice. Acute pancreatitis. N Eng J Med. 2006;18:2142-50.

94. Zhang C, Ge CL, Guo RX, He SG. Effect of IL-4 on altered expression of complement activation regulators in rat pancreatic cells during severe acute pancreatitis. World J Gastroenterol. 2005;11:6770-4.

95. Ramos O Jr, Leitão OR, Repka JC, Barros SG. Pancreatite aguda experimental induzida pela L-arginina: avaliação histológica e bioquímica. Arq Gastroenterol. 2005;42:55-9.

96. Manes G, Kahl S, Schulz, H-U, 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.

97. Bentrem DJ, Joehl RJ. Pancreas: healing response in critical illness. Crit Care Med. 2003;31(Suppl):S582-9.

98. Smotkin J, Tenner S. Laboratory diagnostic tests in acute pancreatitis. J Clin Gastrenterol. 2002;34:459-62.

99. Meek K, Toosie K, Stabile BE, Elbassir M, Murrell Z, Lewis RJ, *et al*. Simplified admission criterion for predicting severe complications of gallstone pancreatitis. Arch Surg. 2000;135:1048-52.

100. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, *et al*. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. N Engl J Med. 2001;345:1359-67.

101. 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.

102. 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.

103. Foitzik T, Mithöfer K, Ferraro MJ, del Castillo CF, Lewandrowski KB, Rattner DW, *et a*l. Time course of bacterial infection of the pancreas and its relation to disease severity in a rodent model of acute necrotizing pancreatitis. Ann Surg. 1994;220:193-8.

104. O'Boyle CJ, MacFie J, Dave K, Sagar PS, Poon P, Mitchell CJ. Alterations in intestinal barrier function do not predispose to translocation of enteric bacteria in gastroenterologic patients. Nutrition. 1998;14:358-62.

105. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki 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.

106. Andersson R, Wang XD. Gut barrier dysfunction in experimental acute pancreatitis. Ann Acad Med Singapore. 1999;28:141-6.

107. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, *et al*. 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.

108. Nagpal K, Minocha VR, Agrawal V, Kapur S. Evaluation of intestinal mucosa permeability function in patients with acute pancreatitis. Am J Surg. 2006;192:24-8.

109. Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. Infect Immun. 1983;39:1252-9.

110. Moody FG, Haley-Russell D, Muncy DM. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis. Dig Dis Sci. 1995;40:1798-804.

111. Quigley EM, Quera R. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. Gastroenterology. 2006;130(Suppl):S78-S90.

112. Nieuwenhuijs VB, van Duijvenbode-Beumer H, Verheem A, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, *et al*. The effects of ATB-229 and octreotide on interdigestive small bowel motility, bacterial overgrowth and bacterial translocation in rats. Eur J Clin Invest. 1999;29:33-40.

113. 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.

114. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. Gut. 1998;42:29-35.

115. Räty S, Sand J, Nordback I. Difference in microbes contaminating pancreatic necrosis in biliary and alcoholic pancreatitis. Int J Pancreatol. 1998;24:187-91.

116. Wells CL, Madaus MA, Simmons RI. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. Rev Infect Dis. 1988;10:958-79.

117. Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KK. Pathogenesis of pancreatic sepsis. Am J Surg. 1993;165:46-52.

118. Schmid SW, Uhl W, Friess H, Malfertheiner P, Büchler W. The role of infection in acute pancreatitis. Gut. 1999;45:311-6.

119. Mangiante G, Colucci 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.

120. Anderson AD, McNaught CE, Jain PK, MacFie J. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. Gut. 2004;53:241-5.

121. Ramos de Marins VM, Varnier Almeida RM, Pereira RA, Barros MB. Factors associated with overweight and central body fat in the city of Rio de Janeiro:

results of a two-stage random sampling survey. Public Health. 2001;115:236-42.

122. Oliveira SP. Changes in food consumption in Brazil. Arch Latinoam Nutr. 1997;47:22-24.

123. Bengmark S. Colonic food: pre- and probiotics. Am J Gastroenterol. 2000;95(Suppl):S5-S7.

124. 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.

ANEXO

Tab. A1. Peso inicial e final (em gramas) e percentual de variação ponderal de cada animal por grupo.

Animal		Grupo I	Grupo II	Grupo III
1	**I**	321,36	314,73	332,34
	F	318,25	323,17	328,40
	VP	- 0,97	+ 2,68	- 1,18
2	**I**	341,32	319,38	334,38
	F	342,01	315,20	336,71
	VP	+ 0,20	- 1,31	+ 0,70
3	**I**	325,53	342,62	339,75
	F	331,49	340,44	325,28
	VP	+ 1,83	- 0,64	- 4,26
4	**I**	343,99	315,27	305,49
	F	345,30	310,97	309,80
	VP	+ 0,38	- 1,36	+ 1,41
5	**I**	335,99	332,29	334,62
	F	336,65	319,72	338,99
	VP	+ 0,20	- 3,78	+ 1,31
6	**I**	342,11	315,07	330,00
	F	334,29	330,41	307,96
	VP	- 2,28	+ 4,87	- 6,68
7	**I**	342,61	332,20	317,36
	F	338,50	329,81	314,57
	VP	- 1,20	- 0,71	- 0,88
8	**I**	311,33	320,30	303,47
	F	333,90	325,39	302,56
	VP	+ 7,25	+ 1,59	- 0,30
9	**I**	335,72	334,80	342,88
	F	341,50	338,24	334,29
	VP	+ 1,72	+ 1,03	- 2,50
10	**I**	317,11	313,92	332,61
	F	321,85	316,36	341,22
	VP	+ 1,49	+ 0,78	+ 2,59
Peso corporal médio	**D1**	331,51 $\pm$ 12,05	324,06 $\pm$ 10,42	327,29 $\pm$ 13,76
	D15	334,07 $\pm$ 8,74	324,97 $\pm$ 9,8	325,97 $\pm$ 15,65

I – peso inicial; F – peso final; VP – variação ponderal; D1 – Dia 1; D15 – Dia 15

Tab. A2. Ingestão total de ração (em gramas) de cada animal, por grupo, entre os dias 01 e 14 do experimento.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III
1	231,97	304,54	231,15
2	252,87	271,76	239,00
3	244,17	281,21	256,95
4	278,14	296,33	224,68
5	235,74	236,77	289,07
6	237,6	330,08	207,19
7	260,42	315,76	226,58
8	349,12	323,85	213,91
9	267,38	297,24	274,31
10	262,18	314,16	250,62
Consumo médio diário	18,71 ± 2,43	18,14 ± 2,08	18,51 ± 1,31

Tab. A3. Ingestão total de água (em mililitros) de cada animal, por grupo, entre os dias 01 e 14 do experimento.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III
1	447	630	451
2	452	519	453
3	461	643	541
4	614	563	371
5	509	444	574
6	432	581	362
7	509	573	401
8	671	607	319
9	526	589	559
10	584	629	448
Consumo médio diário	34,7 ± 5,31	38,52 ± 3,98	29,86 ± 5,83

Tab. A4. Valores da contagem leucocitária ($10^3/mm^3$), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal	Grupo I – hora da coleta sangüínea			Grupo II – hora da coleta sangüínea			Grupo III – hora da coleta sangüínea		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
1	10,9	16,1	13,2	11,5	13,6	13,1	9,6	21,1	13,7
2	11,3	20,6	17,1	11,9	9,4	12,9	10,1	23,7	11,9
3	10,5	*	14,1	13,2	17,8	20,2	10,7	19,9	15,9
4	*	16,1	15,2	12,5	18,9	11,7	10,0 #	- - -	- - -
5	12,7	*	14,1	8,5	20,0	14,5	10,0	20,4	16,4
6	10,6	20,0	17,4	8,3	12,3	12,9	12,7	20,5	25,5
7	13,6	17,1	14,1	8,2	16,8	15,9	11,6	20,2	12,6
8	13,2	16,1	13,3	13,3	12,5	12,0	16,8	26,6	16,3
9	* #	- - -	- - -	10,5	14,3	14,9	13,3	21,2	14,7
10	10,8	15,7	16,4	8,7	17,0	11,4	13,2	15,7	10,1
Média	10,65	17,38	14,99	10,66	15,26	13,95	11,8	21,03	15,23
± DP	±1,26	±2,04	±1,61	±2,09	±3,36	±2,63	±2,25	±2,94	±4,41

*** -** amostra sangüínea coagulada; # - óbito após a coleta sangüínea
DP – desvio padrão

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

Animal	Grupo I – hora da coleta sangüínea			Grupo II – hora da coleta sangüínea			Grupo III – hora da coleta sangüínea		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
1	200	122	142	168	123	180	145	141	129
2	169	126	140	164	175	175	163	235	176
3	172	139	167	167	167	177	168	148	161
4	166	154	167	162	142	125	174 #	- - -	- - -
5	163	*	177	139	192	153	163	134	129
6	169	164	133	168	194	173	157	229	182
7	165	155	170	171	194	187	177	313	204
8	173	166	167	175	195	187	192	289	139
9	170 #	- - -	- - -	152	149	156	170	136	147
10	173	123	125	154	175	187	165	145	174
Média	164,56	143,63	154,22	162	170,6	170	167,4	196,67	160,11
± DP	±10,4	±18,43	±19,08	±10,77	±25,77	±19,89	±12,48	±70,99	±25,99

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; # - óbito após a coleta sangüínea
DP – desvio padrão

Tab. A6. Valores da amilasemia (U/l), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal	Grupo I – hora da coleta sangüínea			Grupo II – hora da coleta sangüínea			Grupo III – hora da coleta sangüínea		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
1	649	568	284	684	3190	2921	553	1253	663
2	609	560	236	612	1626	1688	777	1314	1068
3	703	648	335	674	3935	5568	458	1873	1139
4	636	548	618	18	2857	3249	465 #	- - -	- - -
5	695	*	309	691	1100	1594	670	1377	886
6	664	680	318	671	1709	2023	419	2441	2569
7	495	597	332	678	1350	2138	797	2067	2806
8	722	718	376	739	1058	947	454	1849	619
9	756 #	- - -	- - -	693	1423	1642	662	1275	1111
10	742	651	318	781	1446	1445	537	4239	2389
Média	667,1	621,25	347,33	684,1	1969,4	2321,5	609,2	1965,3	1472,2
± DP	±76,66	±62,05	±108,44	±49,9	±992,73	±1330,5	±142	±947,53	±862,68

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; # - óbito após a coleta sangüínea
DP – desvio padrão

Tab. A7. Valores da lipasemia (U/l), em cada momento de coleta sangüínea.

Animal	Grupo I – hora da coleta sangüínea			Grupo II – hora da coleta sangüínea			Grupo III – hora da coleta sangüínea		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
1	4,1	4,3	6,7	3,5	284,5	217,7	4,6	252,7	54,9
2	6,0	3,3	3,7	5,5	203,9	261,2	4,5	113,9	120,1
3	4,6	5,0	3,1	2,5	422,3	741,2	3,4	240,7	150,6
4	4,6	3,7	3,8	5,3	243,6	183,5	4,4 #	- - -	- - -
5	4,1	*	6,0	3,4	185,1	265,5	3,9	144,9	64,1
6	6,5	5,3	4,8	3,4	128,0	215,6	4,1	498,4	540,9
7	5,3	2,9	5,7	4,8	149,6	265,8	3,6	435,8	720,8
8	4,1	4,0	5,2	7,8	185,1	250,6	4,2	314,5	113,8
9	4,7 #	- - -	- - -	4,9	182,6	251,3	4,1	136,8	138,9
10	4,1	2,3	4,4	2,4	143,5	179,4	4,1	311,7	609,8
Média	4,81	3,85	4,82	4,35	213,07	283,12	4,09	271,8	279,32
± DP	±0,86	±1,02	±1,19	±1,65	±87,14	±164,17	±0,38	±133,22	±264,16

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; # - óbito após a coleta sangüínea
DP – desvio padrão

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

Animal	Grupo I – hora da coleta sangüínea			Grupo II – hora da coleta sangüínea			Grupo III – hora da coleta sangüínea		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
1	9,3	8,9	8,2	10,1	8,7	7,6	9,4	9,8	8,7
2	9,2	9,4	8,3	9,6	8,	7,8	9,2	8,8	8,0
3	8,9	9,5	8,2	9,6	9,6	7,5	9,2	9,3	8,4
4	9,5	9,1	8,4	9,4	9,6	8,6	9,1 #	- - -	- - -
5	9,3	*	8,3	9,1	8,9	7,6	9,2	9,1	8,5
6	9,5	9,5	8,5	9,7	9,1	8,3	8,9	8,4	7,5
7	9,4	8,6	8,3	10,1	8,9	7,8	9,9	9,0	8,3
8	9,0	9,4	8,7	9,8	9,2	9,0	9,4	8,5	8,2
9	9,4 #	- - -	- - -	9,8	9,4	8,2	10,1	9,5	8,5
10	†	9,8	8,6	9,7	9,1	7,6	9,7	9,5	8,6
Média	9,3	9,27	8,39	9,69	9,12	8,09	9,41	9,0	8,3
± DP	±0,21	±0,38	±0,18	±0,30	±0,33	±0,54	±0,38	±0,40	±0,70

* - amostra sangüínea insuficiente para análise; # - óbito após a coleta sangüínea; † - turvamento da amostra sangüínea, impossibilitando a dosagem
DP – desvio padrão

Tab. A9. Colonização bacteriana, por animal, nos grupos II e III.

Animal	Grupo II					Grupo III				
	P	F	B	LN	LP	P	F	B	LN	LP
1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	óbito	- - -	- - -	- - -	- - -
5	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
8	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
10	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0

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

Tab. A10. Identificação da espécie bacteriana e do número de tecidos colonizados, por animal, nos grupos II e III.

Animal	Grupo II			Grupo III		
	E. coli	***S. aureus***	***P. aeruginosa***	***E. coli***	***S. aureus***	***P. aeruginosa***
1	- - -	- - -	2	4	- - -	- - -
2	1	- - -	2	- - -	- - -	- - -
3	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
4	- - -	- - -	- - -	óbito	- - -	- - -
5	- - -	- - -	- - -	3	- - -	- - -
6	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	1
7	1	- - -	- - -	- - -	- - -	3
8	1	- - -	- - -	- - -	- - -	3
9	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	2
10	- - -	1	- - -	- - -	- - -	2