

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Marlus Moreira

**ESTUDO DA AÇÃO DO IMUNOSSUPRESSOR
TACROLIMUS NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL
INDUZIDA PELA ARGININA**

Curitiba

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Marlus Moreira

**ESTUDO DA AÇÃO DO IMUNOSSUPRESSOR
TACROLIMUS NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL
INDUZIDA PELA ARGININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador : Dr. Jorge Fouto Matias
Co-orientador : Dr. João Carlos D. Repka
Coordenador : Dr. Jorge Fouto Matias

Curitiba

2008

Moreira, Marlus

Estudo da ação do imunossupressor tacrolimus na pancreatite aguda experimental induzida pela arginina / Marlus Moreira. Curitiba, 2008.

56 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Jorge Fouto Matias

Co-orientador: João Carlos D. Repka

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Pancreatite. 2. Tacrolimo. 3. Amilase. 4. Glicemia. 5. Ratos. I. Título. II. Matias, Jorge Fouto. III. Repka, João Carlos D.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno MARLUS MOREIRA

Título da Dissertação AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TACROLIMUS NA
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA ARGININA

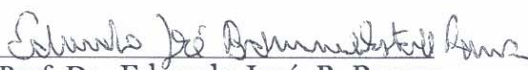
CONCEITOS EMITIDOS:

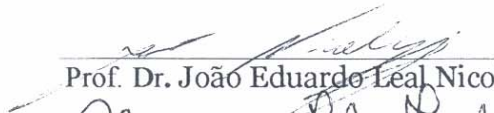
Prof. Dr. Eduardo José B. Ramos	Conceito emitido 4	Equivalência 9,5
Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi	Conceito emitido A	Equivalência 9,5
Prof. Dr. Alexandre C. Teixeira de Freitas	Conceito emitido A	Equivalência 9,5


Conceito Final de Avaliação: A

Conceito: A Equivalência 9,5

Curitiba, 09 de julho de 2008


Prof. Dr. Eduardo José B. Ramos


Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi


Prof. Dr. Alexandre C. Teixeira de Freitas



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 320ª Dissertação de Mestrado do 445º do Programa para conclusão da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **MARLUS MOREIRA**, com o título **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TACROLIMUS NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA ARGININA** Linha de Pesquisa: Diagnóstico e Avaliação das Repercussões da Resposta Inflamatória Clínica e Experimental em Cirurgia na **Área de Concentração**: Clínica Cirúrgica tendo como orientador Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

Às sete horas e trinta minutos do dia nove de julho de dois mil e oito, no Auditório da CAD no 7º andar central sala 701 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída pela Banca Examinadora pelos Professores Doutores **JOÃO EDUARDO LEAL NICOLUZZI**, **EDUARDO JOSÉ BROMMELSTROET RAMOS** E **ALEXANDRE COUTINHO TEIXEIRA DE FREITAS** e sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O Candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.


JOÃO EDUARDO LEAL NICOLUZZI


EDUARDO JOSÉ BROMMELSTROET RAMOS


ALEXANDRE COUTINHO TEIXEIRA DE FREITAS

Dedicatória

À minha esposa Claudia e ao meu filho Lucas, pela compreensão e apoio.

À minha mãe, pela educação recebida.

Aos meus professores, pela formação.

Agradecimentos

Consigno aqui, cumprindo um dever gratíssimo, os meus agradecimentos àqueles que contribuíram para a minha formação em Medicina e para a execução deste estudo.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- À Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron.
- Ao Professor Doutor Jorge Fouto Matias.
- Ao Professor Doutor João Carlos Domingues Repka.
- À Doutora Juliana Werner.
- Ao Doutor Pedro Ernesto Caron.
- Ao Doutor Carlos José Franco de Souza.
- À Bibliotecária Áurea Costin.
- À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Regina Sass.
- Ao Doutor Matheus Martin Macri.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1. OBJETIVOS	2
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
	2.1. PANCREATITE E MODELOS EXPERIMENTAIS	3
	2.1.1. Modelos invasivos de pancreatite	4
	2.1.2. Modelos não invasivos de pancreatite aguda	5
	2.2. TACROLIMUS	7
	2.2.1. Mecanismo de ação do tacrolimus	8
	2.2.2. Farmacocinética do tacrolimus	10
	2.2.3. O tacrolimus e pancreatite	10
3	MATERIAL E MÉTODO	12
	3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	12
	3.1.1. Caracterização da amostra	12
	3.1.2. Condições de experimentação	12
	3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
	3.3.1. Preparação da solução de L-Arginina	13
	3.3.2. Injeção por via intraperitoneal	13
	3.3. INDUÇÃO DE PANCREATITE PELA ARGININA	14
	3.4. TRATAMENTO PELO TACROLIMUS	14
	3.5. COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISES LABORATORIAIS	14

3.5.1. Dosagens de Amilase e Glicose	15
3.5.2. Dosagem de Tacrolimus	15
3.5.3. Análise histológica	16
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4 RESULTADOS	18
4.1. NÍVEIS DE AMILASE	18
4.2. NÍVEIS DE GLICOSE	20
4.3. NÍVEIS DE TACROLIMUS	21
4.4. EXAMES HISTOLÓGICOS	23
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	FÓRMULAS ESTRUTURAL E MOLECULAR DO TACROLIMUS SEGUNDO FUJISAWA, 1993.	8
FIGURA 2	COMPLEXO BAÇO-PÂNCREAS RESSECADO	17
FIGURA 3	FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE PÂNCREAS DE RATO NORMAL GRUPO C ,AUMENTO 10X - Coloração HE, DEMONSTRANDO ÁCINOS E ILHOTAS PRESERVADOS.	25
FIGURA 4	FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE PÂNCREAS DE RATO INOCULADO COM ARGININA E TRATADO PELO TACROLIMUS GRUPO PT, DEMONSTRANDO ATROFIA SEVERA DE ÁCINOS PANCREÁTICOS ACOMPANHADA DE EDEMA E INFILTRAÇÃO POR POPULAÇÃO MISTA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (AUMENTO 10X - Coloração HE)	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DEMONSTRATIVO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
TABELA 2	CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA A AVALIAÇÃO DA PANCREATITE	17
TABELA 3	VALORES INDIVIDUAIS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE AMILASE (unidades/dl)	18
TABELA 4	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AMILASE (MÉTODO T-STUDENT)	19
TABELA 5	VALORES INDIVIDUAIS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE (mg/dl)	20
TABELA 6	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AMILASE (MÉTODO T-STUDENT)	20
TABELA 7	VALORES INDIVIDUAIS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TACROLIMUS (ng/ml)	21
TABELA 8	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE TACROLIMUS (MÉTODO T-STUDENT)	21

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE AMILASE (unidade/litro) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS	19
GRÁFICO 2	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE GLICEMIA (mg/dl) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS	21
GRÁFICO 3	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE TACROLIMUS (ng/ml) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS	22
GRÁFICO 4	DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE HEMORRAGIA NO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO	23
GRÁFICO 5	DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE EDEMA NO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO	23
GRÁFICO 6	DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE INFILTRAÇÃO INFLAMATÓRIA NO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO	24
GRÁFICO 7	DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE ATROFIA DO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO	24

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	–	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
RNA	–	Ácido ribonucléico
CD	–	<i>Cluster of differentiation</i> (Clone de Diferenciação)
COBEA	–	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
MEIA	–	Enzima-imunoensaio de micropartículas
ELISA	–	<i>Enzyme Linked Immunesorbent Assay</i> (Teste Imunoenzimático)
TNF α	–	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL	–	Interleucina
$\mu\text{g}/\text{kg}$	–	Microgramas por kilograma
μl	–	Microlitros
mg	–	miligramas
ng/ml	–	nanogramas por mililitro
pH	–	Potencial hidrogeniônico
OAP	–	Proteína ativadora de um octâmero
rpm	–	Rotações por minuto
SDMO	–	Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
SRE	–	Sistema retículo-endotelial
U/ml	–	Unidades por mililitro

RESUMO

Introdução: O pâncreas tem sido citado como possível alvo da toxicidade do tacrolimus, devido à ocorrência de pancreatite aguda após o transplante e uso deste agente imunossupressivo. Entretanto, não há ainda consenso sobre a toxicidade pancreática, por não ser considerada um efeito colateral do tratamento imunossupressivo, porque a incidência de problemas pancreáticos é alta entre os receptores de transplantes pancreáticos, ficando difícil apontar o fármaco como desencadeante do processo uma vez que o órgão alvo sofreu intensa manipulação e isquemia. **Objetivo:** Verificar se o tacrolimus administrado em ratos em vigência de pancreatite induzida pela L-Arginina interfere: nos níveis séricos da amilase, da glicose e no padrão histológico do parênquima pancreático. **Material e Método:** A amostra constituiu-se de 40 ratos Wistar separados em quatro grupos com 10 ratos cada. Grupo controle (C) para estabelecer os valores de referência, grupo tacrolimus (T), grupo pancreatite (P) e grupo pancreatite-tacrolimus (PT). Em todos os grupos foram avaliados os níveis séricos de amilase, glicemia e tacrolimus e feitas avaliações histológicas do pâncreas, considerando os seguintes padrões histológicos: edema, infiltração inflamatória, hemorragia e atrofia pela coloração de hematoxilina e eosina. A indução de pancreatite foi feita pela inoculação de L-Arginina na dose de 500mg/100mg por via intra-peritoneal e o tratamento com tacrolimus na dose de 1µg/kg por via sub-cutânea por quatro dias. Os resultados foram comparados pelo método estatístico T-Student e adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Resultados: Ocorreram dois óbitos no grupo P. As dosagens de amilase foram significativamente maiores nos grupos P, T e PT quando comparadas ao grupo C ($p=0,0000$) e não houve diferença significativa entre as médias dos grupos P e PT ($p=0,1636$). As glicemias não diferiram entre os grupos P, T e PT quando comparadas ao grupo C ($p>0,05$). Houve detecção sérica de tacrolimus somente nos grupos T e PT e estas não diferiram entre si ($p=0,7112$) e nos grupos P e C não houve detecção. Quanto à avaliação histológica do pâncreas, observaram-se edema moderado e severo no grupo PT e leve e moderado no grupo P. Infiltração inflamatória moderada no grupo P e moderada e severa no grupo PT. A atrofia pancreática foi observada em escala de moderada e severa nos grupos P e PT. Não foram observadas alterações histológicas no grupo T quando comparado ao grupo C. **Conclusões:** O tratamento pelo tacrolimus induziu aumento significativo nos níveis séricos de amilase em ratos normais porém não demonstrou efeito significativo nos níveis desta enzima em ratos com pancreatite. O tratamento pelo tacrolimus não alterou a glicemia e o padrão histológico do parênquima pancreático de ratos normais. Houve ocorrência de edema e infiltração inflamatória com maior severidade no parênquima pancreático dos ratos tratados com tacrolimus em vigência de pancreatite.

Descritores : ratos, pancreatite, tacrolimus, amilase, glicemia e histopatologia

ABSTRACT

Introduction: The use of tacrolimus as an immunosuppressive drug after transplantation and the role of acute pancreatitis have been described as a possible toxicity effect of this drug in the pancreatic tissue. However, there isn't an agreement concerning this toxicity for many reasons. For example, the toxicity is not considered itself a side effect of the immunosuppressive treatment. Moreover, there is a high incidence of pancreatic problems among the pancreas receptors, what makes difficult to indicate this drug as a starter of this process because the organ has been manipulated and has suffered ischemia. **Objective:** Verify if tacrolimus (FK 506), when administrated to rats during acute pancreatitis induced by L-Arginine will interfere on the seric levels of amylase and glycemia and on the histological pattern in the pancreatic tissue. **Methods:** The experiment consisted of 40 Wistar rats separated in four groups of 10: the control group (C) for reference, the tacrolimus group (T), the pancreatitis group (P) and the pancreatitis-tacrolimus group (PT). In all the groups was analyzed the seric levels of amylase and glycemia and the histological pancreatic pattern, which was evaluated by occurrence of: edema, inflammatory infiltration, bleeding and atrophy. The pancreatitis was induced by intraperitoneal injection of 500mg/kg of L-arginine, and the treatment with tacrolimus was done by administration of 1µg/Kg subcutaneously during four days. The results were analyzed by the T-Student method, using the statistical significance for $p \leq 0,05$. **Results:** Two rats of the P group died. The levels of amylase had significant increase in the groups P, T and PT when compared to the C group ($p=0,0000$) and there was no significant difference between the rats of the P and PT groups ($P=0,1636$). No significant difference in the glycemia levels was found in the P, T and PT groups when compared to the C group ($p>0,05$). There was seric detection of tacrolimus in the T and PT groups and both of them were equal ($P=0,7112$). It was observed a moderated and severe edema in the PT group and a mild and moderated one in the P group. Moderated inflammatory infiltration in the P group and moderated and severe in the PT group. Pancreatic atrophy was observed in moderated and severe levels in the group P and PT. There was no histological alteration in the T group when compared to the C group. **Conclusions:** The treatment by tacrolimus induced significant increase in the serical levels of amylase in normal rats, however, it didn't show significant effect in the levels of this enzyme in the rats with pancreatitis. The treatment by tacrolimus didn't change the glycemia and the histological pattern in the pancreatic tissue of normal rats. Edema and inflammatory infiltration occurred with a major degree of severity in the rats with pancreatitis and treated with tacrolimus.

Key words: rats, pancreatitis, tacrolimus, amylase, glycemia, histopathology.

1 Introdução

A última década foi marcada por um avanço significativo no resultado dos transplantes, com aumento substancial na sobrevida do enxerto e do paciente a curto e longo prazo.

Uma série de fatores contribuiu para este resultado: aprimoramento na técnica cirúrgica, progresso nas técnicas de exames imunológicos para seleção de doador, conhecimento mais profundo do mecanismo de rejeição através da biologia molecular, descoberta de potentes agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções, soluções para preservação de órgãos com melhor eficácia e aparecimento de novas e poderosas drogas imunossupressoras.

Entre os imunossupressores mais utilizados encontra-se o tacrolimus, que é um antibiótico macrolídeo isolado da cultura de um microrganismo denominado *Streptomyces tsukubaensis*, com mecanismo de ação que pouco difere ao da ciclosporina.

Os efeitos colaterais aceitos do tacrolimus são semelhantes aos da ciclosporina, possuindo a vantagem de não induzir hirsutismo, sendo a hipertensão arterial, a hiperlipidemia e a hiperplasia gengival menos severas. Alguns trabalhos têm demonstrado que a conversão da ciclosporina para o tacrolimus é muito benéfica para pacientes cujas reações colaterais acima descritas são muito acentuadas.

A principal desvantagem da droga é o efeito diabetogênico, cuja incidência é dose-dependente, e diminui quando seu nível sérico encontra-se abaixo de 10 ng/ml.

Tem como ação biológica o fato de inibir as respostas celulares e humorais pela sua intervenção nos mecanismos de síntese e liberação da interleucina 2. O pâncreas tem sido citado como possível alvo da toxicidade do tacrolimus, devido à ocorrência de pancreatite aguda após o transplante e uso deste agente imunossupressivo (TODO e

colaboradores, 1989 e OHARA e colaboradores, 1990). Entretanto, não há ainda consenso sobre a toxicidade pancreática, por não ser considerada um efeito colateral do tratamento imunossupressivo, pois a incidência de problemas pancreáticos é alta entre os receptores desse órgão, ficando difícil apontar o fármaco como desencadeante do processo uma vez que o órgão alvo sofreu intensa manipulação e isquemia.

1.1. OBJETIVO

Verificar se o tacrolimus administrado em ratos em vigência de pancreatite induzida pela L-Arginina interfere:

- Nos níveis séricos de amilase;
 - Nos níveis séricos de glicose;
 - No padrão histológico do parênquima pancreático.
-
-

2 Revisão da Literatura

2.1. PANCREATITE E MODELOS EXPERIMENTAIS

A pancreatite aguda é condição resultante do processo inflamatório agudo no pâncreas podendo apresentar-se como um distúrbio suave e autolimitado, ou sob a forma de doença grave de evolução muitas vezes fatal. (WARSHAW, 1987; STERR, 1989).

Na pancreatite aguda intersticial a mortalidade é menor que 2%, porém na pancreatite necrotizante os índices atingem 10% em necrose estéril e 30% na infectada. (BRADLEY, 1993; BANKS, 1994, 1993).

Desde 1966 após o primeiro transplante de pâncreas relatado em humanos (Kelly e cols.), já foram realizados mais de 23 mil implantes pancreáticos (Gruessner e cols.) e sempre com crescente melhora nos resultados conforme evolução dos procedimentos técnicos, materiais e imunossupressores. Sobretudo após o início do uso da ciclosporina na década de 70 e mais recentemente com advento de drogas ainda mais potentes.

Dentre elas está o Tacrolimus, uma das mais usadas, podendo chegar a ser a droga de base em 80% dos transplantes hepáticos e 30% dos renais e embora muito eficaz como imunossupressivo, o FK 506 - como também é conhecido o Tacrolimus - não tem seu uso isento de complicações. Relatos de hiperglicemia com potencial diabetogênico, hiperamilasemia, pancreatite aguda, insuficiência hepática e disfunções renais vem sendo relatados na vigência do seu uso (RAMOS, 2007). Diabetes insulino-dependente pode ocorrer em até 30% dos pacientes e com melhora do quadro após redução da sua dose ou suspensão do uso (RAMOS, 2007). Casos de pancreatite em pacientes pós-transplante de órgãos vem sendo observados e com grande gravidade. Sá *et al.*(2008), em revisão recente, encontrou a pancreatite como causa de insucesso do transplante pancreático e perda

técnica do enxerto em 20,3% dos casos. Ficando atrás somente de trombose vascular (52%) e à frente de infecções (18,3%), fístulas (6,5%) e sangramento (2,4%).

Ainda persistem dúvidas acerca de inúmeros aspectos da patogenia e fisiopatologia da doença e, portanto, da melhor terapêutica a ser adotada (STERR, 1989; BANERJEE, 1994).

O potencial de lesão pancreática ao uso de tacrolimus não é totalmente esclarecido, especialmente na vigência de pancreatite, o que torna o manejo clínico delicado em pacientes transplantados.

Por estas razões, pesquisadores há mais de 140 anos têm induzido pancreatite através de meios experimentais em diferentes espécies animais, utilizando modelos animais invasivos e não invasivos. O modelo adequado deveria ser tecnicamente simples e possuir características evolutivas que provoquem no animal alterações pancreáticas semelhantes às aquelas observadas em seres humanos.

2.1.1. MODELOS INVASIVOS DE PANCREATITE

A maioria dos modelos de pancreatite aguda em animais, procura se assemelhar, à situação clínica de pancreatite aguda induzida por cálculos da vesícula biliar. Esta variedade de doença desencadeada pela migração do cálculo vesicular, através do trato biliar ao duodeno é relativamente freqüente. (ACOSTA, 1974). Três diferentes mecanismos têm sido sugeridos, através dos quais os cálculos em sua passagem pelo trato biliar, podem causar pancreatite. Os cálculos migram da vesícula biliar e ficam impactados na papila, causando obstrução no fluxo do suco pancreático e da bile. Este canal comum poderia permitir à bile refluir para o ducto pancreático (OPIE, 1901) causando, assim, pancreatite. Modelos em animais envolvendo injeção de bile ou componentes da bile no ducto pancreático, são baseados na hipótese do canal comum, inicialmente proposto por EUGENE OPIE. Sob o

ponto de vista de perspectiva histórica, a primeira pancreatite experimental foi induzida por CLAUDE BERNARD, em 1856, que injetou mistura de bile e óleo de oliva no ducto pancreático de cães, produzindo assim, pancreatite necrotizante (BERNARD, 1856).

Um dos compostos melhor padronizado para este tipo de pancreatite, é o taurocolato de sódio (SUM et al., 1970; LANKISCH et al., 1989). A injeção de 0,2 ml de de solução contendo taurocolato de sódio, induz pancreatite necrotizante com mortalidade associada de, aproximadamente, 71% no período de 72 horas. Atribui-se como princípio fisiopatológico mais importante, o efeito detergente dos ácidos biliares na membrana celular (AHO & NEVALAINEN, 1980).

Quando os cálculos da vesícula biliar ficam impactados na papila, podem ocasionar obstrução do ducto pancreático. Essas alterações permitiriam extravasamento da secreção de enzimas no interstício pancreático (REBER et al., 1979). Baseados nesta hipótese encontra-se grande parte dos modelos experimentais que empregam a ligação do ducto pancreático como evento fisiopatológico acionador. Os modelos animais que empregam a técnica do laço duodenal fechado (PFEFFER, 1957), baseados no refluxo da secreção duodenal para o interior do parênquima pancreático, simulam experimentalmente esta situação.

Desta forma, permanece um verdadeiro desafio científico provar se o refluxo de bile ou a combinação da obstrução do ducto pancreático e biliar representa ou não, o evento crítico para a pancreatite aguda em seres humanos.

2.1.2. MODELOS NÃO INVASIVOS DE PANCREATITE AGUDA

A grande vantagem destes modelos não invasivos é de serem tecnicamente simples e reproduzíveis. Sua desvantagem reside no fato de que os mecanismos

fisiopatológicos envolvidos na indução da pancreatite não estão relacionados com a doença em humanos.

Entretanto as características morfológicas e bioquímicas destes modelos assemelham-se àquelas encontradas nos indivíduos com pancreatite. Além disso, os modelos não invasivos mostram-se efetivos na pesquisa dos regimes terapêuticos.

Em 1895, MOURET relatou que a excessiva estimulação neuronal poderia induzir à vacuolização em células acinares, e danificar o pâncreas exócrino. Desde então, o conceito de hiperestimulação do pâncreas, como princípio patogênico para indução da pancreatite, foi repetidamente empregado.

O modelo melhor padronizado e caracterizado, é a pancreatite induzida pela ceruleína (análogo da pancreozimina-colecistoquinina), estabelecida por LAMPEL & KERN, 1977; ADLER et al., 1979. A pancreatite induzida por secretagogos tem sido utilizada com sucesso em hamsters sírios (ADLER et al., 1986), camundongos (NIEDERAU et al., 1985) e cães (RENNER & WISNER Jr, 1983) e, juntamente com o modelo induzido por dieta, sugerem uma patogênese alternativa de pancreatite através da qual o tripsinogênio é ativado dentro de grandes vacúolos pelas enzimas lisossomais como a catepsina B. A observação de que a dieta suplementada com etionina, análogo etílico da metionina, pode induzir pancreatite foi, primeiramente, relatada em laboratório por Hans Popper (FORMER & POPPER, 1950).

TANI et al. em 1990, examinaram as características bioquímicas e histológicas de um novo modelo experimental de pancreatite aguda induzida por doses excessivas de arginina em ratos. Os ratos foram inoculados com uma única dose intra-peritoneal de 500 mg/100 g de peso corpóreo de L-Arginina. Em 12 a 24 horas após, níveis séricos de amilase, lipase e tripsinogênio alcançaram valores aumentados 2, 5 e 20 vezes, respectivamente, em relação àqueles dos ratos controle, retornando aos níveis normais após 24 a 48 horas. O conteúdo de proteína pancreática, DNA e enzimas digestivas estava marcadamente reduzido após a inoculação de arginina e alcançaram seu ponto mais baixo

em 72 horas. Após 14 dias estes níveis retornaram aos valores normais. Este modelo não invasivo mostrou ser de fácil reprodução e acessível quando comparado aos outros modelos experimentais.

Doses excessivas de aminoácidos básicos como a lisina, metionina (KAUFMAN et al., 1960) e arginina (KISHINO & KAWAMURA, 1984), têm a capacidade de lesionar o pâncreas de ratos, bem como retardar o crescimento de algumas neoplasias, embora seu mecanismo seja desconhecido (MILNER & STEPANOVICH, 1979).

MINIZUMA et al, em 1984, demonstraram pioneiramente, severas lesões pancreáticas causadas pelo excesso de arginina. O metabolismo protéico é mais ativo nas células acinares pancreáticas, e provavelmente, estas são os primeiros alvos na superdosagem, resultando em degeneração ou necrose. Segundo KISHINO & KAWAMURA (1984) e KISHINO et al. (1986), as alterações imediatas após a inoculação de arginina, caracterizaram-se por mudanças na estrutura mitocondrial, progressiva desorganização e degeneração do retículo endoplasmático das células acinares, e redução do número de grânulos de zimogênio.

Recentemente, DELANEY et al., (1993) descreveram novo modelo de atrofia pancreática usando injeções intraperitoneais seriadas de L-Arginina.

2.2. TACROLIMUS

Com o advento dos imunossupressores para manutenção de órgãos transplantados, como o tacrolimus, diversas especulações têm sido feitas com respeito ao seu uso crônico, uma vez que não somente sua utilização seja restrita a pacientes transplantados, mas em outras doenças também apresenta resultados favoráveis como na artrite reumatóide e psoríase.

O FK 506, como também é conhecido o tacrolimus, foi isolado pela primeira vez em 1985 pela fermentação do caldo do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, encontrado no solo na cidade de Tsukuba, região norte do Japão (GOTO e colaboradores, 1987). Apesar da estrutura química ser completamente diferente da ciclosporina, o tacrolimus possui similaridades com a mesma, porém com propriedades imunossupressoras mais potentes. Trata-se de uma lactona macrocíclica hidrofóbica, é um novo antibiótico macrolídeo com peso molecular de 822,05; é uma substância altamente hidrofóbica, aparece como cristais brancos ou com poder de cristalização (TANAKA e colaboradores, 1987). As fórmulas estrutural e molecular encontram-se demonstradas na figura 1.

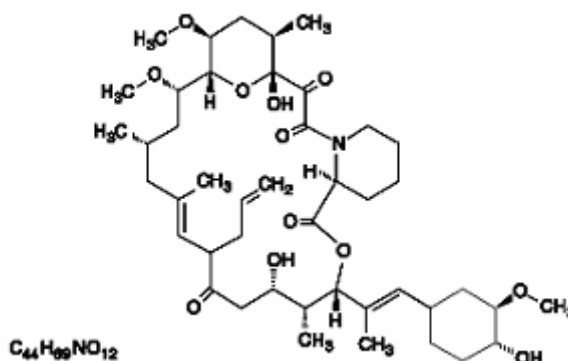


FIGURA 1 FÓRMULAS ESTRUTURAL E MOLECULAR DO TACROLIMUS SEGUNDO FUJISAWA, 1993.

2.2.1. MECANISMO DE AÇÃO DO TACROLIMUS

Tem como ação biológica o fato de inibir a resposta de base celular e humoral. O processo imune, o qual segue uma série de eventos, inicia com o contato do antígeno com o macrófago existente no tecido linfático. Este irá fagocitá-lo e apresentá-lo aos linfócitos. Além disso, ele produzirá uma linfocina, a interleucina-1, capaz de ativar os linfócitos T, promovendo a proliferação de células T específicas. Neste momento, algumas das células T ativadas, denominadas células T auxiliares, irão produzir mediadores protéicos.

A IL-2, uma das linfocinas secretadas pelas células T auxiliares, desempenha um papel fundamental, ativando o crescimento de linfócitos T ativados e iniciando um processo de proliferação ou expansão clonal de células T citotóxicas e células T supressoras, onde irão exercer seus efeitos.

A formação de linfocinas pelas células T auxiliares é importante para o fator de crescimento de células B ativadas, pois dependem da ativação de células T auxiliares para formar anticorpos e terem um potente efeito sobre o antígeno. Esta é a fase sensível à ação do tacrolimus. Ele inibe a secreção de várias citocinas, IL-2, IL-3, IL-4 e interferon- α (IFN- α) (ABBAS, 1994).

Segundo ZEEVI e colaboradores (1987) o FK 506 se difunde prontamente para o citoplasma das células T. Uma das vias que as células-alvo inibem é a da transdução do sinal, ativada pelo receptor destas células. Essa ativação causa, entre outras alterações, aumento da cálcio intracelular, o que ativa serina-treonina fosfatase Ca^{2+} dependente, conhecida como calcineurina. Um substrato da calcineurina, o componente citoplasmático do NFAT (NFATc - fator nuclear das células T ativadas) passa do citoplasma para o núcleo depois da desfosforilação. Ao associar-se a outros componentes nucleares da NFAT (NFATn), este substrato da calcineurina regula a transcrição de muitos genes, incluindo aqueles que codificam a interleucina-2 (IL-2), o fator estimulador de colônias e granulócitos, macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral α (FNT α), o interferon α (IFN- α) e outras interleucinas.

A calcineurina desfosforila outra proteína reguladora citoplasmática, a proteína ativadora de um octâmero (OAP), o que também exige desfosforilação para transporte até o núcleo em que serve como fator de transcrição. O tacrolimus, associado à sua proteína de ligação, FKBP (proteína de ligação do FK-506) se une de forma estável à calcineurina na superfície endofacial das células T e inibe a atividade catalítica da calcineurina e, como consequência, a translocação nuclear do NFAT e da OAP.

2.2.2. FARMACOCINÉTICA DO TACROLIMUS

O tempo de meia-vida do tacrolimus é em média de 5,7 horas (com desvio padrão de 4,6 horas). Seu pico de concentração máxima no sangue e plasma atingem aproximadamente 1,5-3,5 horas. É altamente lipofílico e sua distribuição se estende por todo o tecido. No sangue o imunossupressor é sequestrado pelos eritrócitos, por isso a concentração no plasma é aproximadamente 10 a 30 vezes menor do que sua concentração no sangue.

Tacrolimus é extensamente metabolizado no fígado, pelas enzimas citocromo P-450 IIIA, primeiramente por desmetilação e hidroxilação. Menos de 1% de sua composição original é excretada inalterada pela urina e bile. Disfunções hepáticas estão associadas com a elevação da concentração plasmática do tacrolimus, prolongando o tempo de meia-vida e reduzindo a depuração plasmática (HONBO e colaboradores 1987).

2.2.3. O TACROLIMUS E PANCREATITE

O pâncreas tem sido citado como possível alvo da toxicidade do tacrolimus, devido à ocorrência de pancreatite aguda após o transplante e uso deste agente imunossupressivo (TODO e colaboradores, 1989 e OHARA e colaboradores, 1990). Entretanto, não há ainda consenso sobre a toxicidade pancreática, por não ser considerada um efeito colateral do tratamento imunossupressivo, pois a incidência de problemas pancreáticos é alta entre os receptores desse órgão, ficando difícil apontar o fármaco como desencadeante do processo uma vez que o órgão alvo sofreu intensa manipulação e isquemia.

Entre as publicações relacionadas a este tema, ITO e YAMAGUCHI (1993), reportaram que a ciclosporina-A, imunossupressor que desempenha o mesmo mecanismo que o tacrolimus, estimula a secreção enzimática anormal de enzimas pancreáticas e que

doses terapêuticas podem induzir pancreatite aguda hemorrágica quando o pâncreas é estimulado.

ITO e colaboradores (1993) em estudo experimental em ratos indicaram que doses terapêuticas de FK506 induzem pancreatite aguda quando o pâncreas é estimulado pela ciruleína, um análogo da colicistoquinina, e que deve-se ter precauções quanto à administração de agentes imunossupressivos em receptores de transplantes com doença pancreática e também deve-se evitar a estimulação do pâncreas após seu transplante. Estes autores avaliaram também neste estudo a ação de um inibidor de protease, o gabexate mesilato, o qual demonstrou efeito protetivo da função endócrina.

Em estudo da Universidade de Kyoto, em pancreatite induzida em ratos com ceruleína e etionina, constatou-se que tanto a ciclosporina quanto o tacrolimus pioram a evolução do quadro, principalmente na pancreatite necro-hemorrágica e que a ciclosporina tem potencial agravante mais intenso que o tacrolimus. Embora quando avaliados isoladamente não foram capazes de induzir pancreatite (ECHIGO, Y et al. 1995).

Diante das evidências de que o tacrolimus pode elevar a atividade secretória do pâncreas e da possibilidade de reproduzir pancreatite em ratos e ainda do advento em nosso meio do transplante de pâncreas e o uso cada vez mais constante do tacrolimus, foi que levantou-se a hipótese de avaliar em um modelo experimental de pancreatite em ratos, a ação do tacrolimus.

3 Material e Método

3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Utilizaram-se no experimento 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, *Rodentia Mammalia*), não isogênicos, pesando $282,4 \pm 12,6$ g, obtidos do biotério da Universidade Federal do Paraná.

3.1.2. CONDIÇÕES DE EXPERIMENTAÇÃO

Os ratos foram mantidos em grupos de cinco, em caixas de polipropileno, adequadas para a espécie (COBEA), devidamente identificadas e cada animal também identificado com marcas permanentes feitas na pelagem, com solução de ácido pícrico comercial a 10%. Foram mantidos em ambiente específico, com temperatura e umidade controladas sob ciclos de iluminação, automaticamente regulados a cada 12 horas. Receberam ração específica para a espécie (NUVILAB, NUVITAL[®]) e água *ad libitum*. Os dejetos e as caixas dos animais eram substituídos a cada 48 horas.

Foram observadas as seguintes normatizações: Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Nomina Anatômica de Walker (WALKER e HOMBERGER, 1997), Lei Federal nº6.638 (1979)¹ e Normas para apresentação de referências e trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2007).

¹ BRASIL, Lei Federal nº6638 de 08 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, p.1, 10 de maio de 1979.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dividiu-se a amostra em 4 grupos, conforme demonstrativo abaixo:

TABELA 1: DEMONSTRATIVO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

GRUPO	IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO	N	OBJETIVO
Controle	C	10	Estabelecer os valores de referência para as dosagens de amilase e avaliações histológicas do pâncreas de ratos normais.
<i>Tacrolimus</i>	T	10	Identificar a ocorrência das alterações séricas de Amilase e das análises histológicas do pâncreas de ratos sob tratamento pelo tacrolimus.
<i>Pancreatite</i>	P	10	Identificar a ocorrência das alterações séricas da Amilase e das análises histológicas do pâncreas de ratos sob estimulação pela Arginina.
<i>Pancreatite e Tacrolimus</i>	PT	10	Identificar a ocorrência das alterações séricas da Amilase e das análises histológicas do pâncreas em animais sob estimulação pela Arginina e tratamento pelo tacrolimus.

3.3. INDUÇÃO DE PANCREATITE PELA ARGININA

3.3.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA

Pesaram-se 20g de L-Arginina (Merck® artigo 1.01542) diluindo-se em volume final de 100ml de solução fisiológica, ajustando-se o pH entre 6,8 – 7,4 com solução tampão de fosfatos.

3.3.2. INJEÇÃO POR VIA INTRAPERITONEAL

Os ratos foram deixados em jejum durante a noite prévia ao experimento. Após pesagem, os ratos dos grupos P e PT receberam injeção intraperitoneal de 500 mg/100g de peso corporal de L-Arginina.

O volume total calculado foi dividido em doses iguais e injetado em duas etapas com intervalos de 15 minutos, em um dos quadrantes inferiores abdominais. Os ratos dos grupos C e FK receberam o mesmo volume de solução fisiológica 0.15 M. Todos os animais receberam alimentação à vontade após a injeção.

3.4. TRATAMENTO PELO TACROLIMUS

Foi utilizado o produto Prograf® (Janssen-Cilag / Fugisawa), sob a forma de injetável com 5mg/ml de Tacrolimus.

A dose utilizada foi a de 1µg/kg de peso e a solução foi preparada a partir de diluições em solução salina isotônica. Os ratos dos grupos FK e A-FK receberam este tratamento durante quatro dias a partir do dia da indução de pancreatite.

3.5. COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISES LABORATORIAIS

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados por inalação com éter sulfúrico e cuba plástica apropriada. A seguir foram colocados em decúbito dorsal e com seringa de 10 ml e agulha de 25 x 8 mm procedia-se à punção cardíaca transtorácica. O sangue coletado foi separado em duas amostras, uma com EDTA para a dosagem de tacrolimus e outra sem anticoagulante foi centrifugada a 700 rpm durante 10 minutos, separando-se a seguir o soro para as determinações de amilase e glicose.

3.5.1. DOSAGENS DE AMILASE E GLICOSE

Foram efetuadas em equipamento automatizado – Sistema COBAS – MIRA “S”, com reativos específicos, seguindo as orientações do fabricante e incluídos padrões positivos e negativos.

3.5.2. DOSAGEM DE TACROLIMUS

Empregou-se o ensaio IMx Tacrolimus II (ABBOT csc 0800-11-90-99), descrito por WINKLER e colaboradores (1995), que baseia-se na metodologia imunoenzimática de micropartículas (MEIA).

Antes do início da seqüência automática IMx, realiza-se uma etapa de pré-tratamento manual, na qual se extrai a amostra de sangue total com um reagente de precipitação, que é depois centrifugada. O sobrenadante é decantado para a cavidade de amostra e os reagentes IMx Tacrolimus II, juntamente com a amostra, são adicionados à célula de reação (reaction vessels -RV) na seguinte seqüência:

- O conjunto probe/eletrodo dispensa a amostra, as micropartículas revestidas de anticorpos monoclonais murinos anti-tacrolimus e o conjugado de tacrolimus-fosfatase alcalina, na cavidade de incubação da célula de reação;
 - O tacrolimus e o conjugado competem pela ligação às micropartículas revestidas com anticorpos anti-tacrolimus formando um complexo “anticorpos-antígenos” e “anticorpos-antígeno-fosfatase alcalina”.
 - Uma alíquota contendo os complexos “anticorpos-antígenos” e “anticorpos-antígenos-fosfatase alcalina” ligados às micropartículas é transferida para a matriz de fibra de vidro. As micropartículas ligam-se irreversivelmente à matriz de fibra de vidro.
 - A matriz é lavada de forma a remover materiais não ligados.
-

- O substrato, 4-Metilumbeliferil-Fosfato, é adicionado à matriz e o produto fluorescente é medido pelo sistema óptico do equipamento.
- São empregados padrões positivos e negativos e as leituras fotocolorimétricas são interpoladas conforme o software IMx Módulo de Ensaio de Transplantes / TDM, versão 4.0.
- Os resultados foram expressados em ng/ml.

3.5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a coleta de sangue, os animais foram recolocados em cuba sob inalação letal de éter sulfúrico. Posteriormente ao sacrifício, os animais foram submetidos a uma abertura ampla da cavidade abdominal sendo ressecado o complexo baço-pâncreas para avaliação histológica.

O pâncreas retirado era colocado em formaldeído a 10% pelo período mínimo de 48 horas para adequada fixação. Secções foram feitas através do longo eixo da glândula, coradas com hematoxilina-eosina e examinados por microscopia óptica (AHO & NEVALAINEN, 1982).

Todos os cortes histológicos foram examinados sem o conhecimento do grupo e período em análise. Foram considerados os seguintes padrões histológicos: edema, infiltração inflamatória, hemorragia e necrose parenquimatosa. (TANI et al., 1990; SCHMIDT et al., 1992). O padrão histológico foi definido de acordo com a presença e predominância das alterações microscópicas descritas na tabela 2.



FIGURA 2 COMPLEXO BAÇO-PÂNCREAS RESSECADO

TABELA 2 : CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA A AVALIAÇÃO DA PANCREATITE

ACHADOS HISTOLÓGICOS		CLASSIFICAÇÃO			
Atrofia		Ausente	Leve	Moderada	Severa
Edema		Ausente	Leve	Moderada	Severa
Infiltração inflamatória		Ausente	Leve	Moderada	Severa
População Inflamatória	- Neutrófilos	Ausente	Leve	Moderada	Severa
	- Macrófagos				
	- Linfócitos				
	- Mista				
<i>Hemorragia</i>		Ausente	Leve	Moderada	Severa
<i>Necrose</i>		Ausente	Leve	Moderada	Severa

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram aplicados os métodos estatísticos de ANOVA e T-Student e adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

4 Resultados

Durante a indução da pancreatite, no grupo arginina houve dois óbitos, ficando a amostra deste grupo com n=8. Com o objetivo de avaliar a existência ou não de diferença nos níveis séricos de amilase, glicose e tacrolimus entre os grupos C, T, P e PT, testou-se a hipótese nula de que o nível médio de amilase nos grupos seria igual à média do grupo C versus a hipótese alternativa de que estes níveis fossem diferentes.

4.1. NÍVEIS DE AMILASE

TABELA 3: VALORES INDIVIDUAIS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE AMILASE (unidades/dl)

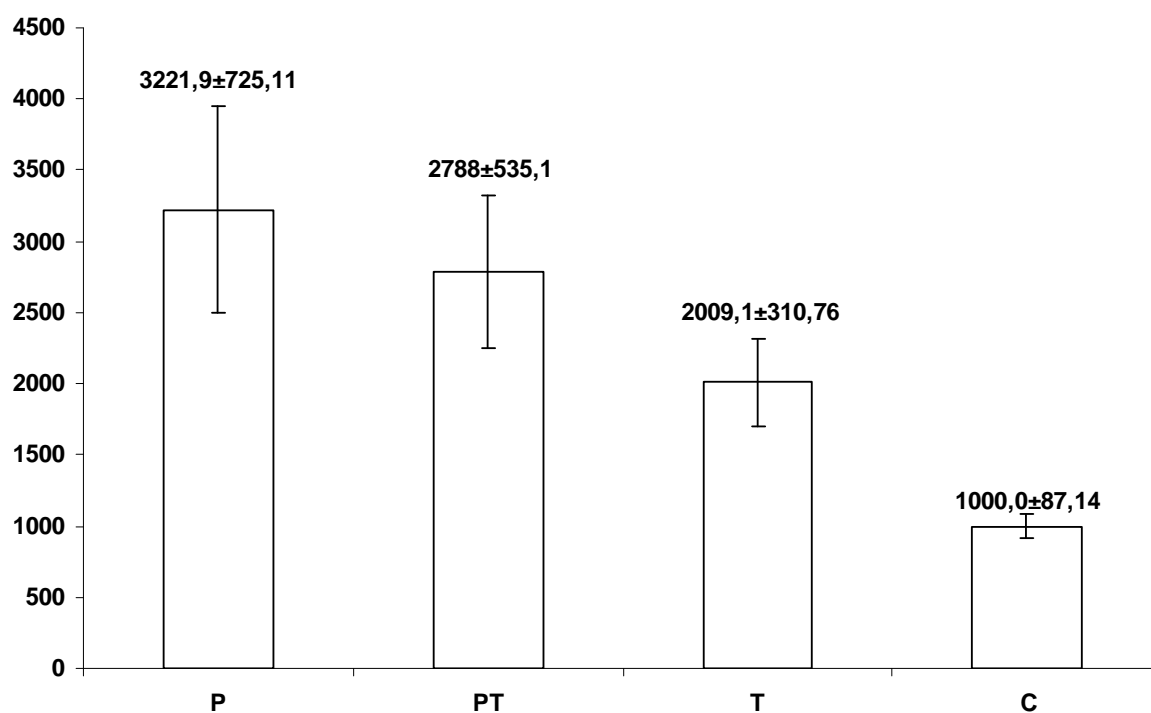
Ratos	P	PT	T	C
1	3856	3689	1951	963
2	4400	2723	1977	1120
3	2700	2970	1979	968
4	3006	3524	2052	960
5	3892	2767	1335	877
6	2620	1924	1685	886
7	2419	2874	2311	985
8	2882	2714	2345	1044
9	---	2500	2224	1110
10	---	2202	2238	1087
Média	3221,9	2788,7	2009,1	1000,0
Erro-padrão	256,37	169,21	98,27	27,55
Desvio-padrão	725,11	535,10	310,76	87,14

A amilasemia dos ratos foi significativamente elevada em todos os grupos quando comparada ao grupo controle ($p=0,0000$), conforme tratamento estatístico demonstrado na tabela 4 e no gráfico 1.

TABELA 4: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AMILASE (MÉTODO T-STUDENT)

Grupos comparados	Valor de p
CxP	0,0000
CxPT	0,0000
CxT	0,0000
PxPT	0,1636
PxT	0,0002
PTxT	0,0009

GRÁFICO 1 : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE AMILASE (unidade/litro) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS



4.2. NÍVEIS DE GLICOSE

TABELA 5: VALORES INDIVIDUAIS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE (mg/dl)

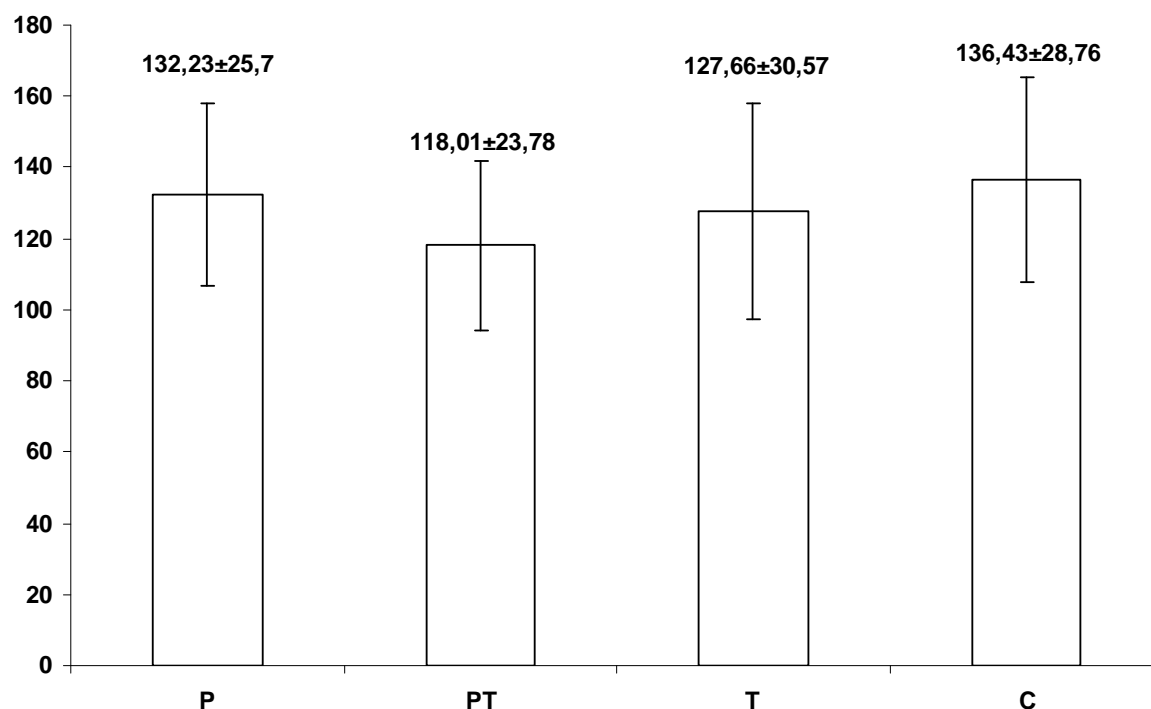
Ratos	P	PT	T	C
1	146,8	101,8	169,6	89,7
2	96,7	114,7	175,9	109
3	151,4	143,3	120,2	169,6
4	120,2	96,7	98,7	175,9
5	108,7	145,9	107,5	120,2
6	138	96,1	113,4	108,7
7	175,9	153,6	147,4	138
8	120,2	98,7	96,5	149,1
9	---	94,6	150,1	142,8
10	---	134,7	97,3	161,3
Média	132,23	118,01	127,66	136,43
Erro-padrão	9,08	7,52	9,64	9,09
Desvio-padrão	25,70	23,78	30,57	28,76

A glicemia dos ratos foi similar em todos os grupos ($p=0,4920$ – ANOVA) e quando comparados ao grupo controle, os grupos P, PT e T também não demonstraram diferença significativa ($p>0,05$), conforme tratamento estatístico demonstrado na tabela 6 e no gráfico 2.

TABELA 6: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AMILASE (MÉTODO T-STUDENT)

Grupos comparados	Valor de p
CxP	0,7518
CxPT	0,1361
CxT	0,1361
PxPT	0,2412
PxT	0,7394
PTxT	0,4405

GRÁFICO 2 : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE GLICEMIA (mg/dl) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS



4.3 NÍVEIS DE TACROLIMUS

TABELA 7: VALORES INDIVIDUAIS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TACROLIMUS (ng/ml)

Ratos	P	PT	T	C
1	0	11	9	0
2	0	9	15	0
3	0	18	11	0
4	0	12	12	0
5	0	8	18	0
6	0	14	17	0
7	0	8	13	0
8	0	11	9	0
9	---	14	16	0
10	---	16	7	0
Média	---	12,1	12,7	---
Erro-padrão	---	1,06	1,18	---
Desvio-padrão	---	3,38	3,74	---

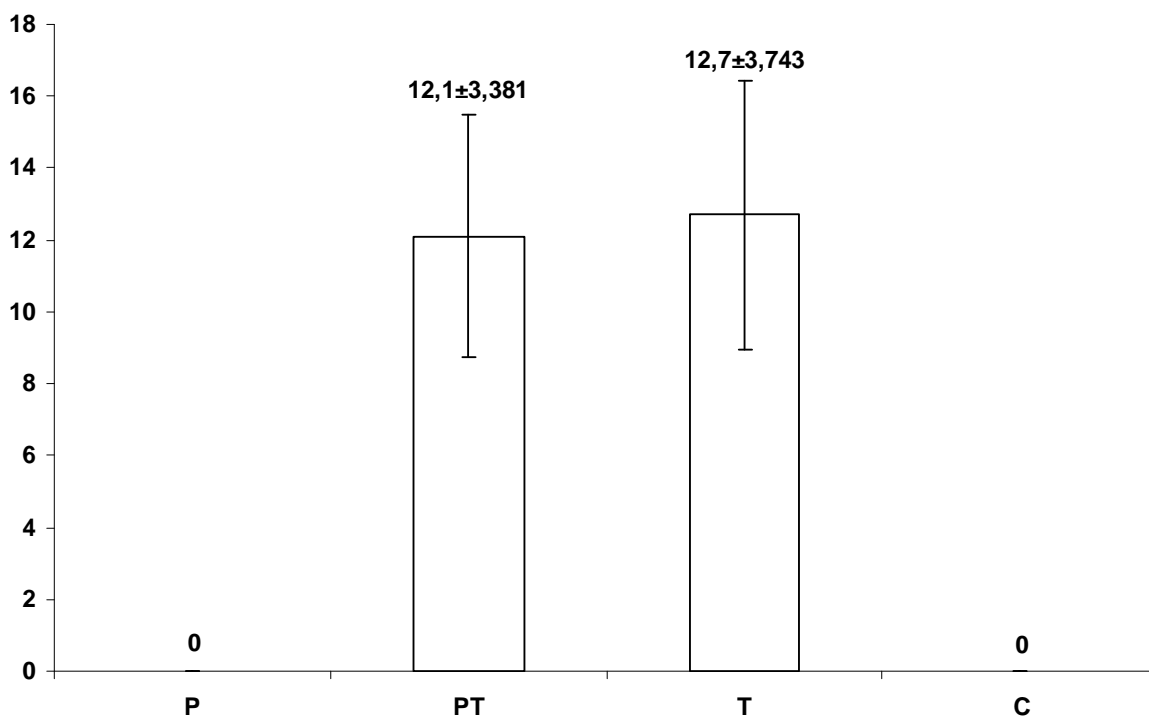
Os níveis séricos de tacrolimus dos ratos foi similar nos grupos PT e T ($p=0,7112$) quando comparada ao grupo controle ($p>0,05$), conforme tratamento estatístico demonstrado na tabela 6 e no gráfico 2.

TABELA 8: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE TACROLIMUS (MÉTODO T-STUDENT)

Grupos comparados	Valor de p
CxP	NA
CxPT	0,0000
CxT	0,0000
PxPT	0,0000
PxT	0,0000
PTxT	0,7112

NA: não se aplica, pois em ambos os grupos os valores foram zero.

GRÁFICO 3 : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE TACROLIMUS (ng/ml) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS



4.4. EXAMES HISTOLÓGICOS

GRÁFICO 4: DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE HEMORRAGIA NO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO

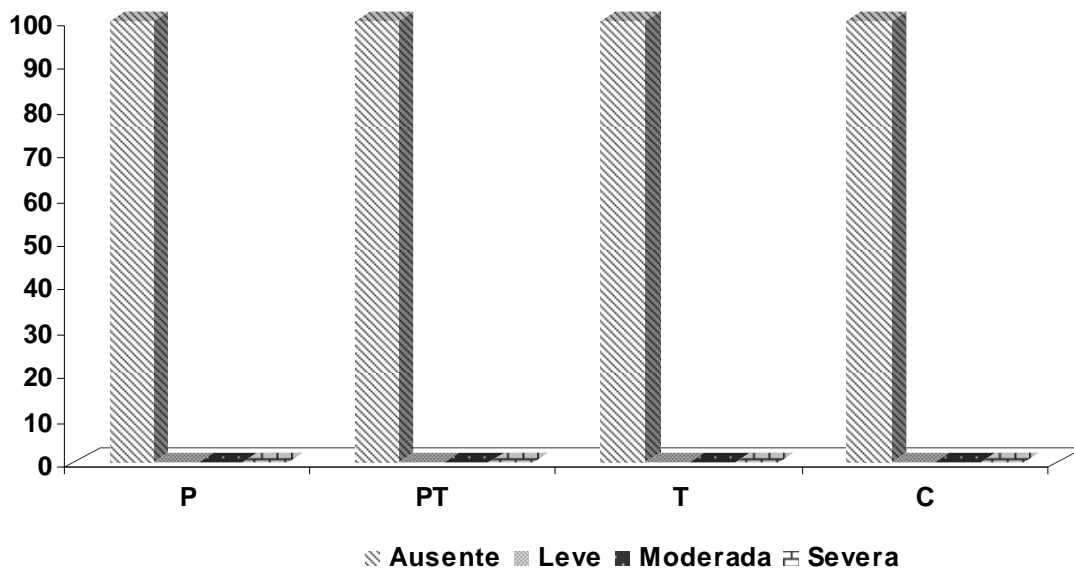


GRÁFICO 5: DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE EDEMA NO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO

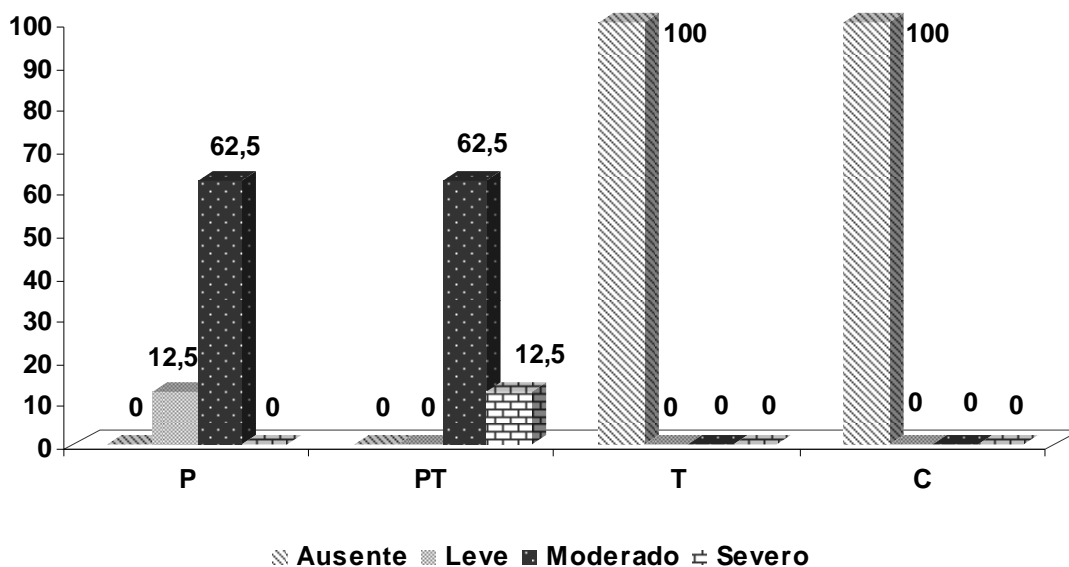


GRÁFICO 6: DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE INFILTRAÇÃO INFLAMATÓRIA NO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO

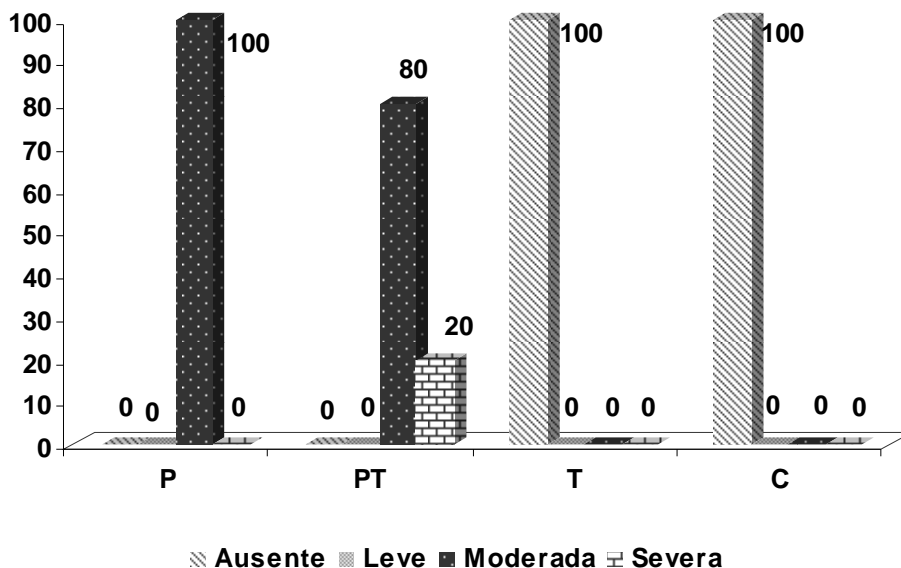
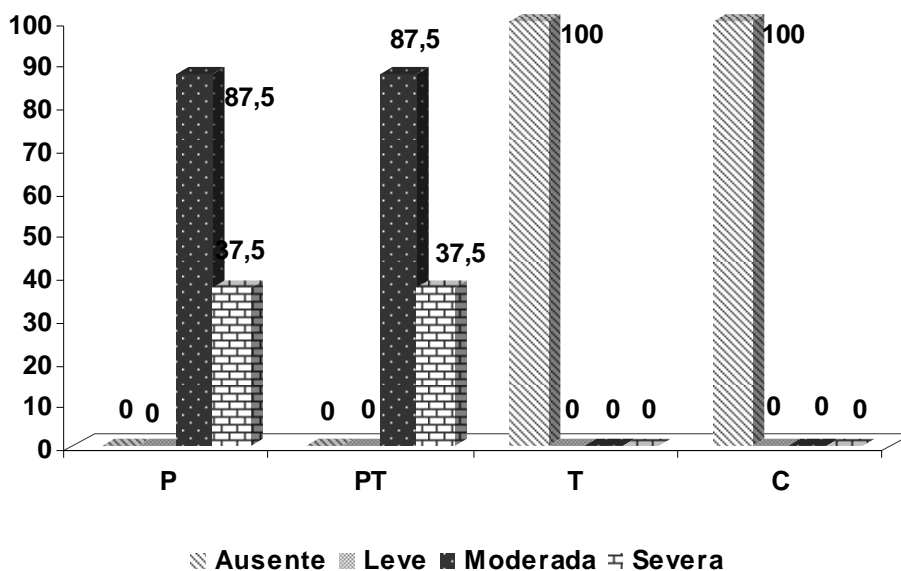


GRÁFICO 7: DEMONSTRATIVO DA PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE ATROFIA DO PARÊNQUIMA PANCREÁTICO



Conforme demonstrado nos gráficos acima pode-se verificar que os grupos T e C não diferiram nas análises histológicas, sendo considerados similares ao grupo c

(figura 3). Quanto aos grupos P e PT, houve diferenças quanto à severidade da atrofia, edema e infiltração inflamatória pancreática, sendo mais intensas no grupo PT (figura 3).

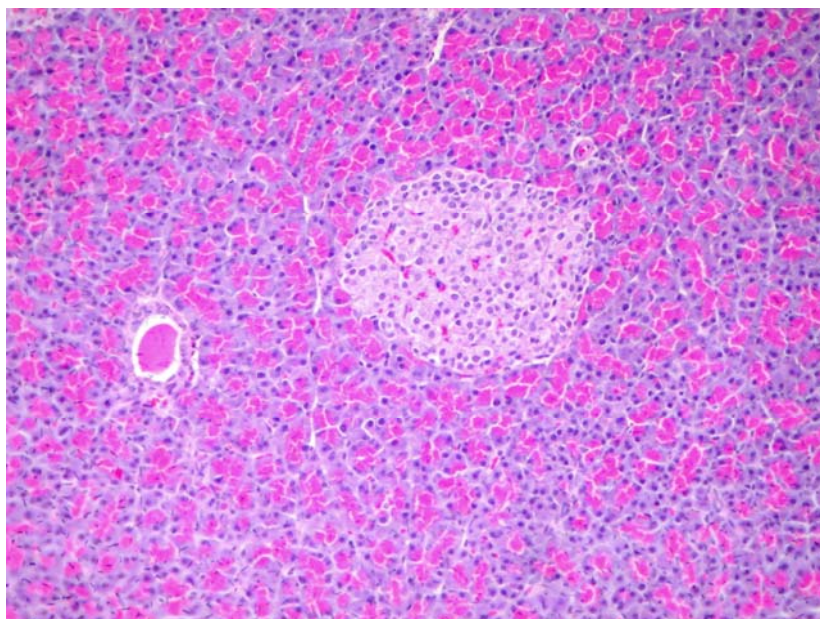


FIGURA 3 FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE PÂNCREAS DE RATO NORMAL GRUPO C ,AUMENTO 10X - Coloração HE, DEMONSTRANDO ÁCINOS E ILHOTAS PRESERVADOS.

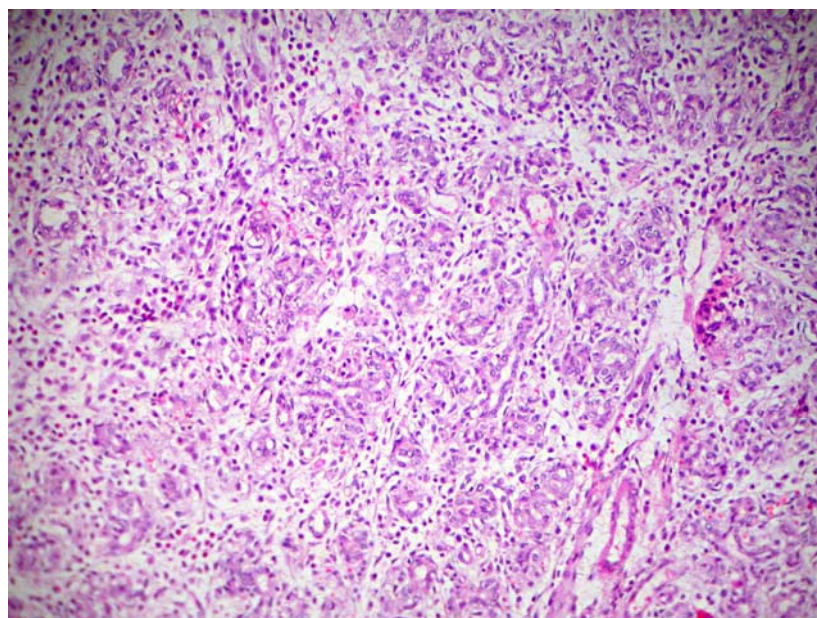


FIGURA 4 FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE PÂNCREAS DE RATO INOCULADO COM ARGININA E TRATADO PELO TACROLIMUS GRUPO PT, DEMONSTRANDO ATROFIA SEVERA DE ÁCINOS PANCREÁTICOS ACOMPANHADA DE EDEMA E INFILTRAÇÃO POR POPULAÇÃO MISTA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (AUMENTO 10X - Coloração HE)

5 Discussão

Modelos animais de experimentação, empregados para o estudo das pancreatites, têm contribuído para o entendimento da fisiopatologia e biologia celular desta doença, embora, nem sempre relacionados com a doença em seres humanos.

Saliente-se enfim, que para serem realizados modelos experimentais de pancreatite aguda, deve-se estar alerta sobre três possíveis condições: inicialmente, a patogênese poderia ser diferente entre o modelo animal e a doença em humanos, o animal poderia responder ao tratamento de forma diferente, embora a doença fosse a mesma e finalmente, o tratamento deveria começar em período logo após a indução do modelo experimental, pois a pancreatite aguda em seres humanos apresenta-se clinicamente, 24 a 36 horas após o início do processo patológico no pâncreas (BANERJEE, 1994).

Embora reconheça-se não se dispor de técnica experimental ideal de indução de pancreatite aguda, as informações que se obtêm nesses modelos, proporcionam considerável importância para compreensão de eventos fisiopatológicos, buscando-se formas de diagnóstico adequado e principalmente, terapêutica mais específica para doença inflamatória aguda do pâncreas. (LERCH & ADLER, 1994).

O modelo experimental do presente estudo baseou-se nos experimentos de TANI *et al.* (1990), que demonstrou uma nova forma de induzir pancreatite aguda necrotizante em ratos através de uma única injeção intraperitoneal de arginina, na concentração de 500mg/100g.

Durante o estudo piloto deste trabalho foi observado que a inoculação da dose total indicada pelos autores causava morte imediata de todos os animais e ao serem necropsiados observou-se a ocorrência de trombose mesentérica. Por este motivo, a dose proposta foi fracionada em duas de 250mg/100g com intervalo mínimo de 30

minutos. Não houve óbitos imediatos após a inoculação, contudo no quarto dia de evolução ocorreram dois óbitos no grupo que recebeu apenas arginina. Este modelo não invasivo mostrou-se de fácil reprodução e acessível quando comparado a outros modelos experimentais de pancreatite aguda.

Sabe-se que doses excessivas de aminoácidos básicos, tais como a lisina (KISHINO et al., 1986) e a metionina (KAUFMAN et al., 1960), assim como a arginina, causam danos ao pâncreas do rato, embora o mecanismo seja desconhecido.

A arginina inibe o crescimento e o desenvolvimento de tumores experimentais, como o fibrossarcoma UCLA e o sarcoma Jensen em ratos (LEVY et al., 1954). Estes estudos revelaram que excesso de arginina reduz a síntese poliamínica e, portanto, inibe o ácido nucléico e a síntese protéica (MILNER et al., 1979).

Devido ao elevado metabolismo protéico nas células acinares pancreáticas, torna-se provável que estas células sejam o primeiro alvo do excesso de arginina, resultando em degeneração, atrofia ou necrose. A análise morfológica revelou predominantemente, modificações mitocondriais que se encontravam severamente danificadas (KLAVINS, 1967; KISHINO, 1986). Uma vez que a atividade mitocondrial produz energia pela síntese de ATP, suas desordens reduzem o suprimento celular energético, lesando organelas intracelulares e o núcleo. Esta desordem mitocondrial seria, portanto, o primeiro sinal de pancreatite necrotizante induzida por excesso de arginina. Em contraste, a formação de vacúolos intracelulares contendo enzimas digestivas pancreáticas e hidrolases lisossomiais, são aspectos característicos da fase inicial de pancreatite aguda causada por estimulação da ceruleína em ratos (WATANABE et al., 1984) ou por dieta deficiente em colina e suplementada por etionina, em camundongos (KOIKE et al., 1982).

Atualmente tem surgido interesse no fator vascular envolvido na patogenia da pancreatite aguda. Discute-se se a lesão necrotizante é causada por enzimas ou

isquemias. Alterações no fluxo sanguíneo no fígado, pulmões, rins e pâncreas durante a pancreatite aguda grave estão bem documentadas (ANDRÉ, 1988).

Poucas referências são encontradas na literatura sobre a ação do tacrolimus na pancreatite, YAMADA e colaboradores (2001) avaliaram a função das células T e o tacrolimus num modelo experimental de pancreatite em ratos Wistar da variante Bonn/Kobori, os quais desenvolvem naturalmente diabetes e pancreatite. Demonstraram eficácia do tacrolimus na supressão da pancreatite crônica nestes ratos e levantaram a possibilidade de seu uso clínico. Estes autores em sua conclusão mencionaram que em outros estudos este efeito foi inverso, especialmente em modelos experimentais induzidos pela ceruleína.

No presente estudo se consideram exclusivamente os resultados da dosagem de amilase, conforme demonstrado nas tabelas 3 e 4 verifica-se que efetivamente o tacrolimus induziu efeito protetor contra a ação da arginina, pois os resultados do grupo com pancreatite e tratado pelo tacrolimus são menores que os do grupo pancreatite, apesar de que houve aumento da amilase sérica no grupo tratado com tacrolimus em relação ao grupo controle.

O estudo conduzido por Echigo et al. na Universidade de Kyoto em 1995 concluiu que o tacrolimus não tem capacidade de gerar pancreatite aguda mas pode ter efeito deteriorante no órgão por aumentos discretos de amilase e seu papel passa a ser mais importante nos casos de pancreatite necro-hemorrágica onde piora a sobrevivência. No mesmo estudo ainda verificou que a ciclosporina tem mecanismo semelhante, porém é mais agressiva quando comparada ao tacrolimus. Nessa avaliação não foi feito estudo histológico ou glicêmico e os métodos de indução de pancreatite foram com ceruleína por 10 dias e etionina com deficiência em colina por 72h.

No entanto, se forem observados os resultados obtidos nas análises histológicas, pode-se afirmar que o tacrolimus quando inoculado em ratos normais não

alteram a arquitetura histológica pancreática (gráficos 4, 5, 6 e 7), apesar de induzir aumento da secreção de amilase sérica (tabela 3).

Nos grupos que sofreram a indução da pancreatite pela arginina foram observadas alterações histológicas compatíveis com um processo inflamatório agudo (gráfico 6), sendo paradoxal o fato de no grupo tratado pelo tacrolimus ocorreu atrofia do tipo severa de forma similar ao grupo que sofreu somente a indução da pancreatite (gráfico 7).

Da mesma forma, quanto à porcentagem de ocorrência de edema parenquimatoso, a mesma tendência foi observada quanto à maior severidade no grupo induzido com pancreatite pela arginina e tratado com tacrolimus, do que no grupo que sofreu apenas a indução da pancreatite (gráfico 5).

ITO e colaboradores (1994) sugeriram que a vacuolização citoplasmática e a picnose nuclear são causadas pela degeneração das células acinares, tendo sido descrito necrose individual de células acinares mais que picnose nuclear.

Esta necrose vem sendo observada como efeito tóxico direto nas células após tratamento com tacrolimus. Este mesmo autor em estudo prévio (ITO e colaboradores, 1993) observou necrose de células acinares individuais após tratamento com ciclosporina A, contudo, o grau de necrose foi mais severo com ciclosporina A do que com tacrolimus, além disso, o tacrolimus tem efeito tóxico menor na função exócrina do pâncreas tanto morfológica quanto enzimaticamente. De fato os efeitos colaterais clínicos do tacrolimus parecem ser bem menos severos do que aqueles da ciclosporina A (JORDAN e colaboradores 1991).

Sabe-se que a atividade da amilase sérica não se correlaciona clinicamente com a severidade da pancreatite aguda, bem como que as enzimas pancreáticas sorológicas não correlacionam-se com às alterações histológicas observadas no pâncreas (SCHMIDT

et al., 1992). Neste estudo os níveis de amilase sérica permaneceram constantes nos animais do grupo controle, mas elevaram-se significativamente nos animais que receberam injeção de L-arginina e tratamento com tracrólimus (tabela 3).

Estes achados sugerem que os níveis de amilase não se correlacionam diretamente com a gravidade da inflamação. Numerosas tentativas foram feitas no passado para avaliar a sensibilidade, especificidade e valores prognósticos da amilase sérica. (AGARFAL *et al.*, 1990; TIETZ *et al.*, 1986; ROBERT *et al.*, 1986; MOOSSA, 1984; GWOZDZ *et al.*, 1990; ECKFELDT *et al.*, 1985). Apesar da existência de muita controvérsia (DUBICK *et al.*, 1987), a maior parte dos autores concorda que tanto a especificidade como o valor de prognóstico do grau de elevação da amilase sérica são deficientes. (PUOLAKKAINEN, 1988; MOOSSA, 1984).

Pela capacidade de secreção do pâncreas, ele é considerado o tecido humano que possui maiores valores de síntese protéica. Há razões para aceitar-se que células acinares danificadas, mas ainda viáveis, possam causar maior e mais duradoura elevação da amilase sérica do que das células necróticas, incapazes de manterem a produção de enzimas.

Esta análise é compatível com a observação de que os níveis mais altos de amilase sérica são encontrados nos modelos experimentais de pancreatite caracterizados por edema intersticial e morte mínima de células (GULLICK, 1973).

6 Conclusões

1. O tratamento pelo tacrolimus induziu aumento significativo nos níveis séricos de amilase em ratos normais porém não demonstrou efeito significativo nos níveis desta enzima em ratos com pancreatite.
 2. O tratamento pelo tacrolimus não alterou a glicemia e o padrão histológico do parênquima pancreático de ratos normais.
 3. Houve ocorrência de edema e infiltração inflamatória com maior severidade no parênquima pancreático dos ratos tratados com tacrolimus em vigência de pancreatite induzida pela L-Arginina.
-

Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cytokines. In :_____. **Cellular and molecular immunology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1994. cap. 12, p.240-260.

ACOSTA, J.L.; LEDESMA, C.L. Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis. **N. Engl J Med**, v.290, p.484-487, 1974.

ADLER, G. et al. Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. **Virchows Archiv A Pathol Anat Histol**, v.382, p.31-47, 1979.

ADLER,G. et al. Experimental 2 models and concepts in acute pancreatitis. In: GO, V. N. L. et al. (ed.) **The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, Diseases**. New York: Raven, 1986.

AGARFAL, N. et al. Evaluating tests for acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol.**, v.85, p.356-366, 1990.

AHO H.J.et al. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis. **Scand J Gastroenterol.**, v.15, p.411-416, 1980.

ANDRÉ, E.A. **Pancreatite Aguda experimental grave em ratos: avaliação da permeabilidade capilar com utilização de hemácias e albumina marcadas com cromo radioativo (⁵¹ Cr) e de água triciada**. São Paulo, 1992. 65p. Tese (Doutorado em Gastroenterologia Clínica) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

BANERJEE, A.K. et al. Experimental models of acute pancreatitis. **Brit J Surgery**, v.81, p.1096-1103, 1994.

BANERJEE, A.K.; STEELE, R.J.C. Current views on the Pathophysiology of acute pancreatitis. **GUT**, 1994. (in press).

BANKS, P.A. Medical management of acute pancreatitis and Complications. In: GO, V.L.W. et al.(ed.) **The exocrine pancreas: biology, pathology and disease**. 2.ed. New York: Raven, 1993. p.593-611.

BANKS,P.A. A new classification system for acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v.89, n.89, p.151-152, 1994.

BERNARD, C. Leçons de Physiologie Experimentale. **Paris: Bailliere, 1856. p.278.**

BRADLEY, E.L.III. A clinical based classification system for Acute pancreatitis. **Arch Surg**, v.128, p.586-90, 1993.

DELANEY, C.P. et al. Pancreatic atrophy: a new model using serial intra-peritoneal injections of L-arginine. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.28, n.12, p.1086-90, Dec. 1993.

DUBICK, M.A. et al. Digestive enzymes and protease inhibitors in Plasma from patients with acute pancreatitis. **Pancreas**, v.2, p.198-194, 1987.

ECHIGO, Y et al. Effects of cyclosporine and tacrolimus (FK 506) on acute pancreatitis in mice. **Arch Surg**, jan 1995; 130:64-68.

ECKFELDT, J.H. et al. Serum tests for pancreatitis in patients with abdominal pain. **Arch Pathol Lab Med**, v.109, p.316-319, 1985.

FORMER, E.; POPPER, H. Production of acute pancreatitis with ethionine and its prevention by methionine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.74, p.838-840, 1950.

FUJISAWA - (<http://www.lclabs.com> – consulta em 26 de maio de 2008)

GOTO, T. et al. Discovery of FK 506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. **Transplantation Proceedings**. 5:4-8. 1987

GRUESSNER AC, SUTHERLAND DE. Pancreas transplant outcomes for United States and non-United States cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant registry (IPTR) as of June 2004. **Clin Transplant**. 2005;19(4): 433-55.

GULLICK, H.D. Relation of the magnitude of blood enzyme elevation to severity Of exocrine pancreatic disease. **Am J Dig Dis**, v.18, p.375-383, 1973.

GWOZDZ, G.P. et al. Comparative evaluation of the diagnosis of acute pancreatitis based on Serum and urine enzyme assays. **Clin chim Acta**, v.187, p.243-254, 1990.

HONBO, T. et al. The oral dosage form of FK 506. **Transplantation Proceedings**. 5:17-22. 1987

ITO, T. Protective effects of gabexate mesilate on acute pancreatitis induced by tacrolimus (FK 506) in rats in which the pancreas was stimulated. **Journal of Gastroenterology**. 29:305-313. 1994.

JORDAN, M.L. et al. Initial studies of FK 506 in renal transplantation. **Cleve Clin J Med**. 58:444-446. 1991

KAUFMAN, N. et al. Pancreatic damage induced by excess methionine. **Arch Pathol**, v.70, p.331-337, 1960.

KELLY, WD e cols. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. **Surgery**. 1967; 61 (6): 827-37.

KISHINO, Y. et al. Ultracytochemistry pancreatic Damage induced by excess lysine. **Virchows Arch** (Cell Pathol), v.52 , p.153-167, 1986.

KISHINO, Y.; KAWAMURA S. Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine. **Virchows Archiv** (Cell Pathol), v.47, p.149-155, 1984.

KLAVINS, J.V. Pathology of amino acid excess. VII. Phenylalanine and Tyrosine. **Arch Pathol**, v.84, p.238-250, 1967.

KOIKE, K. et al. Pancreatic effects of methionine: Blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. **Am J Physiol**, v.242, p.G297-G307, 1982.

LAMPEL, M.; KERN, H.F.. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. **Virchows Arch** (Pathol Anat), v.373, p.97-117, 1977.

LANKISCH, P.G. et al. Effect of Foy - 305 (comostate) on severe acute pancreatitis in two experimental animal models. **Gastroenterology**, v.96, p.193-199, 1989.

LERCH, M.M.; ADLER, G. Experimental animal models of acute pancreatitis. **International Journal of Pancreatology**, v.15, n.3, p.159-170, 1994.

LEVY, H.M. et al. Effect of arginine on tumor growth in rats. **Cancer Res**, v.14, p.198-200, 1954.

MILNER, J.A.; STEPANOVICH, L.V. Inhibitory effect of dietary arginine on growth of Erlich ascites tumor cells in mice. **J Nutr**, v.109, p.489-494, 1979.

MINIZUMA, T. et al. Effect of injecting excess arginine on rat pancreas. **J Nutr**, v.114, p.467-471, 1984.

MOOSSA, A.R. Diagnostic tests and procedures in acute pancreatitis. **N Engl J Med**, v.311, p.639-643, 1984.

MOURET, J. Contribution à l'étude des cellules glandulaires (pancreas). **J Anat Physiol**, v.31, p.221-236, 1895.

NIEDERAU, C. et al. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice; Protective effects of proglumide, benzotript and secretin. **Gastroenterology**, v.88, p.1192-1204, 1985.

OHARA, K. et al. Toxicologic evaluation of FK 506. **Transplant Proc.** 19:89-92. 1987.

OPIE, E.L. The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. **John Hopkins Hosp Bull**, v.12, p.182-188, 1901.

PFEFFER, R.B. et al. The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. **Surg Forum**, v.8, p.248-251, 1957.

PUOLAKKAINEN, P.A. Early, assessment of acute pancreatitis. A comparative Study of computed tomography and laboratory tests. **Acta Chir Scand**, v.155, p. 25-30, 1988.

RAMOS, AFLH. **Avaliação do potencial embriotóxico do Tacrolimus administrado a ratas Wistar**. [Dissertação]. Mestrado em Saúde da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora ; 2007. 80f.

REBER, H.A. et al. The pancreatic duct mucosal barrier. **Ann J Surg**, v.137, p.128-134, 1979.

RENNER, I.G.; WISNER, J.R. Exogenous secretin ameliorates ceruletide induced acute pancreatitis in the dog. **Dig Dis Sci**, v. 28, p.946, 1983.

ROBERT, J.H. et al. Can serum and peritoneal amylase and lipase determinations help in the early prognosis of acute pancreatitis ? **Ann Surg**, v.203, p.163-168, 1986.

SÁ, JR de. et al. Transplante de Pâncreas e Ilhotas em Portadores de Diabetes Mellito. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2008; 52/2, p. 355-66.

SCHMIDT, J. et al. Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental Pancreatitis. **Dig Dis Sci**, v.37, n.9, p.1426-1433, Sept. 1992.

STEER, M.L. Classification and pathogenesis of pancreatitis. **Surg Clin North Am**, v.101, p.1701-1709, 1989.

SUM, P.T. et al. Pathogenesis of bile-induced acute pancreatitis in the dog: Experiments with detergents. **Am J Dig Dis**, v.15, p.637-646, 1970.

TANAKA, H. et al. Physicochemical properties of FK 506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. **Fujisawa Pharmaceutical**. 11-15. 1987.

TANI, S. et al. Pancreatitis induced by excessive doses of Arginine in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.35, n.3, p.367-374, Mar. 1990.

TIETZ, N.W. et al. Laboratory tests in the Differential diagnosis of hyperamylasemia. **Clin Chem**, v.32, p.301-307, 1986.

TODO, S. et al. Renal transplantation baboons under FK 506. **Surgery**. 106:444-450. 1989.

WALKER, WF.; HOMBERGER, DG. Anatomy and Dissection of Rat. 3. ed. New York; W.H.Freeman and Company, 1997. p.15-17.

WARSHAW, A. L. Lowering the level of uncertainty in late pancreatitis. **Gastroenterology**, v.93, p.1434-1437, 1987.

WATANABE, O. et al. Supramaximal caerulein stimulation on the ultrastructure of rat pancreatic Acinar cell: Early morphological changes during development of Experimental pancreatitis. *Am J Physiol*, v.246, p.G475-G467, 1984

WINKLER, M. et al. Comparison of plasma vs whole blood as matrix for FK 506 drug level monitoring. **Transplant Proc**. 27 (1): 822-825. 1995.

YAMADA, T. et al. Role of T cells in development of chronic pancreatitis in male Wistar Bonn/Kobori rats : effects of tacrolimus. **Am J Gastrointest Liver Physiol**. 281:G1397-1404. 2001.

ZEEFI, A. et al. Immunossuppressive effect of FK 506 on in vitro lymphocyte alloactivation : synergism with cyclosporine. **Transplantation Proceedings**. 5:44-40. 1987
