

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - NEFROLOGIA**

IZABEL CRISTINA SCHANDER DE ALMEIDA

EFEITO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO SOBRE AS ALTERAÇÕES RENAISS ASSOCIADAS À PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL

Porto Alegre
2007

IZABEL CRISTINA SCHANDER DE ALMEIDA

**EFEITO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO SOBRE AS
ALTERAÇÕES RENAIAS ASSOCIADAS À PANCREATITE
AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Medicina - área de concentração em Nefrologia.

Orientadores: Prof. Dr. David Saitovitch
Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

A447e Almeida, Izabel Cristina Schander de

Efeito da frutose-1,6 bisfosfato sobre as alterações renais associadas à pancreatite aguda experimental / Izabel Cristina Schander de Almeida; orient. David Saitovitch e Jarbas Rodrigues de Oliveira. Porto Alegre: PUCRS, 2007.

47f.: il. tab. graf.

Apresentada sob a forma de 3 artigos científicos

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

1. FRUTOSE BIFOSFATASE. 2. NEFROPATIAS. 3. RIM/patologia. 4. PANCREATITE. 5. PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL. 6. MODELOS ANIMAIS. 7. RATOS WISTAR. 8. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 9. INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA/prevenção e controle. INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA/FISIOPATOLOGIA. I. Saitovitch, David. II. Oliveira, Jarbas Rodrigues de. III. Título.

C.D.D. 616.07

C.D.U. 616.61:616.37(043.2)

N.L.M. QU 136

A minha família, pelo amor que nos une, pelo
carinho, paciência, amizade, apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Carlos Miguel Alt Barcelos (*in memoriam*), pelo apoio e recomendação que permitiram a realização desse curso de pós-graduação.

A Professora Doutora Melissa Guerra Simões Pires pelo apoio, incentivo, amizade, pelas lições de estatística.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Aline A. Cunha, Carlos Leite, Vasyl C. Saciura, Carolina Bastos, Eduardo Caberlon, Telmo Castaman

Ao Biólogo Luiz Cláudio Davila, pelo apoio com a estatística.

Ao Doutor Carlos Luiz Reichel pela análise histológica e pelas lições de histologia.

Ao Professor Doutor Vinicius Durval da Silva pelo auxílio com as fotos da histologia.

Ao Doutor Ismael Maguilnik pelo apoio e amizade.

Ao Doutor Fabio Alves Torres, coordenador da UCE Adultos do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo apoio, compreensão e incentivo.

À Secretária Regina Ronzani, da UCE Adultos do Hospital São Lucas da PUCRS, pela amizade e pela ajuda com os plantões.

Aos colegas do Hospital São Lucas da PUCRS e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo coleguismo e amizade que permitiram a realização das disciplinas e dos experimentos.

À Bibliotecária Rosária Maria Lucia Prenna Geremia pela ficha catalográfica e ajuda com a formatação do trabalho.

À Sonia, Eloa e Mauricio, do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde, sempre dispostos a ajudar e orientar.

Aos colegas e amigos do setor de Gerenciamento de Custos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela atenção e ajuda.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos Farmacêuticos Carmem Silvana Araújo de Oliveira, José Antonio Tesser Poloni, Fernando Spiller e à acadêmica de Farmácia Michele A. Vieira. A participação na realização dos experimentos, dosagens, e em todas as etapas da realização do curso foi fundamental para a conclusão de mais esta etapa. Acima de tudo, obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo.

AGRADECIMENTO MUITO ESPECIAL

Aos meus orientadores, Professor Doutor David Saitovitch e Professor Doutor Jarbas Rodrigues de Oliveira, pela orientação, ensinamentos, paciência, disponibilidade, amizade, compreensão. São exemplos a serem seguidos.

RESUMO

A insuficiência renal aguda que se desenvolve no curso de uma pancreatite aguda é um fator de mal prognóstico. Os mecanismos fisiopatológicos da insuficiência renal aguda nesses pacientes não estão totalmente elucidados. Como não há tratamento específico para a pancreatite aguda, a frutose-1,6-bisfosfato foi estudada como possível agente preventivo de lesões renais associadas a esta patologia, pois já foi demonstrado o seu papel protetor sobre o rim em outras situações. No presente estudo, a pancreatite aguda foi induzida em ratos Wistar machos, por ligadura do ducto pancreático principal por um período de 12 (doze) horas. Os animais foram divididos em 4(quatro) grupos: *sham* (somente realização de laparotomia), ligadura do ducto pancreático, ligadura do ducto pancreático e administração de solução salina, ligadura do ducto pancreático e administração de frutose-1,6-bisfosfato. A frutose-1,6-bisfosfato e a solução salina foram administradas por via intraperitoneal. Houve hemoconcentração nos animais após indução da pancreatite e esta foi prevenida pela administração de solução salina e frutose-1,6-bisfosfato. A insuficiência renal aguda foi observada após indução da pancreatite (depuração da creatinina endógena= 0,30 mL/min, no grupo *sham*= 0,66 mL/min) provavelmente devido à necrose tubular aguda (fração excretada de sódio=1,48%; *sham*=0,52%). A administração da frutose-1,6-bisfosfato foi capaz de prevenir essas alterações (depuração da creatinina endógena=0,50mL/min, fração excretada de sódio=1,15%). No entanto, o mesmo não foi observado com a solução salina (depuração da creatinina endógena=0,35mL/min, fração excretada de sódio=3,19%). A excreção urinária da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) foi utilizada como marcador de lesão renal. Sua excreção estava elevada no grupo submetido à ligadura do ducto pancreático. A administração de solução salina elevou ainda mais a sua atividade. A frutose-1,6-bisfosfato não foi capaz de prevenir essa elevação. O nível sérico das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizadas para avaliação do estresse oxidativo no curso da pancreatite aguda, mostrou alterações paralelas às do NAG. Há a necessidade do desenvolvimento de um modelo experimental de pancreatite aguda pois há mais perguntas do que respostas. Neste estudo foi demonstrada a reversibilidade da

pancreatite aguda através do desenvolvimento de um modelo experimental de obstrução temporária do ducto pancreático.

Palavras-chave: Insuficiência renal aguda. Pancreatite aguda. Frutose-1,6-bisfosfato. NAG. TBARS.

ABSTRACT

Acute renal failure that develops during an episode of acute pancreatitis worsens the prognosis. The physiopathological mechanisms underlying this complication are not completely understood. As there is no specific treatment for acute pancreatitis, fructose-1,6-bisphosphate was studied as a possible protective agent for its associated renal lesions because it has been demonstrated to protect the kidney in other clinical settings. In the present investigation, acute pancreatitis was induced by 12-h pancreatic duct ligation in male Wistar rats. Rats were divided into 4 groups: sham, pancreatic duct ligation, pancreatic duct ligation and saline administration and pancreatic duct ligation and fructose-1,6-bisphosphate administration. Fructose-1,6-bisphosphate or saline were given intraperitoneally. Hemoconcentration was observed after pancreatitis induction, but prevented by administration of either saline or fructose-1,6-bisphosphate. Acute renal failure was also observed after pancreatitis induction (creatinine clearance=0.30 mL/min; sham group=0.66mL/min) probably due to acute tubular necrosis (fractional sodium excretion=1.48%; sham=0.52%). Fructose-1,6-bisphosphate prevented these alterations (creatinine clearance=0.50mL/min, fractional sodium excretion=1.15%). However, the same was not observed with saline (creatinine clearance=0.35mL/min, fractional sodium excretion=3.19%). Urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) was also used as a marker of renal lesion. Its excretion was elevated in the pancreatic duct ligation group and even more elevated after saline administration. Fructose-1,6-bisphosphate was not capable of preventing this rise. Nevertheless, it prevented NAG urinary increase after saline administration on the pancreatitis group. Serum level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was used to evaluate oxidative stress, and have shown the same alterations as those observed with NAG. Clearly, a clinically applicable experimental model of acute pancreatitis needs to be developed, as more questions than answers remain. Here, it was demonstrated the reversibility of acute pancreatitis by the development of an experimental model of temporary pancreatic duct obstruction.

Keywords: Acute renal failure. Acute pancreatitis. Fructose-1,6-bisphosphate. NAG. TBARS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 ARTIGO 1	18
4 ARTIGO 2	28
5 ARTIGO 3	36
6 DISCUSSÃO GERAL	44
7 CONCLUSÕES	47

1 INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda é uma patologia potencialmente letal e sem tratamento específico (1). Apesar dos avanços recentes no manejo intensivo desses pacientes, a mortalidade nos casos graves continua elevada, próxima a 20% (2,3).

A disfunção de múltiplos órgãos na fase inicial (incluindo insuficiências cardiovascular, pulmonar, renal e/ou hepática) e a sepse, na fase tardia, (devido a infecção secundária do tecido pancreático desvitalizado e dos tecidos peripancreáticos) está entre os principais fatores que contribuem para a alta mortalidade na pancreatite aguda severa (2).

A insuficiência renal aguda, de modo especial, é um problema importante na evolução desse grupo de pacientes e daqueles em que se determinam maior gravidade (a etiologia pancreática é um fator de mau prognóstico em pacientes com insuficiência renal aguda, que internam em unidades de tratamento intensivo) (4).

Tran et al., em 1993, analisando 267 pacientes com pancreatite aguda, encontraram uma prevalência de insuficiência renal aguda (IRA) de 16%, sendo a mortalidade por IRA de 81% e concluíram que o prognóstico de pacientes com essa complicação era extremamente grave, principalmente se associado com doença crônica, insuficiências de outros órgãos ou complicações locais (5).

Kes et al, em 1996, relataram uma incidência de 14% de IRA em 563 pacientes estudados. A terapia de substituição renal foi necessária em 62% desses pacientes, sendo que somente 4,1% sobreviveram (6). Gutierrez et al.(4) reafirmaram esse achado. Nesse estudo, a incidência de IRA foi de 42%. Com mortalidade de 71,2%, comparada com 6,8% nos pacientes sem IRA. Houve necessidade de terapia de substituição renal em 63,6% dos pacientes e a mortalidade foi de 89,3% (4).

A preocupação com a lesão renal secundária à pancreatite aguda não é recente. Em 1971, Gupta (7) publicou um estudo sobre lesões glomerulares na pancreatite aguda. As alterações encontradas sugeriam ser o glomérulo o sítio primário de lesão semelhante àquelas vistas na glomerulopatia membranosa. Werner et al. (8) estudando 11 pacientes com pancreatite aguda, por 72 horas a partir da admissão, concluíram que a taxa de filtração glomerular média, o fluxo

plasmático renal efetivo e o fluxo plasmático renal verdadeiro estavam diminuídos; a resistência vascular renal estava aumentada na fase aguda.

Em relato de caso, Fox et al. (9) apresentaram um caso de necrose cortical renal bilateral, diagnosticado por biópsia renal e arteriografia renal seletiva. Recentemente, Zhang et al. (10) demonstraram, em estudo experimental em ratos, que o fluxo sanguíneo renal começa a diminuir 30 minutos após indução da pancreatite e atinge o seu valor mais baixo após 12 horas (tempo do estudo).

Os radicais livres de oxigênio têm sido citados como mediadores inflamatórios precoces no curso de uma pancreatite aguda, contribuindo para disfunção celular, tanto localmente como em órgãos distantes (11). Urunuela et al. (12) demonstraram, em seu estudo, que as células acinares pancreáticas produzem grandes quantidades de radicais livres de oxigênio em estágios precoces da pancreatite aguda induzida por obstrução do ducto pancreático em ratos.

A determinação de enzimas urinárias tem sido empregada para avaliação da função renal, devido a maior sensibilidade, além de alterarem mais precocemente que outros marcadores comumente empregados (por exemplo, a creatinina) (13). No estudo de Westhuyzen et al. (14), sobre pacientes admitidos em unidade de tratamento intensivo e que desenvolveram insuficiência renal aguda, as enzimas γ glutamil transpeptidase (γ GT), fosfatase alcalina, α - e π -glutamina S-transferase e a N-acetil- β -glucosaminidase (NAG) estavam elevadas na internação e foram úteis em prever o surgimento de insuficiência renal aguda.

Gasting et al. (15) afirmaram que a enzimúria lisossomal tem grande valor na detecção precoce de nefropatia diabética. As enzimas citadas no estudo incluem a N-acetil- β -glucosaminidase (NAG), o γ GT, fosfatase alcalina, sendo que a NAG foi o indicador mais útil (15).

Da Silva Melo et al. (16) estudaram a excreção urinária de γ GT, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e desidrogenase láctica (LDH) em ratos intoxicados com paracetamol, constataram que as mesmas que estavam elevadas em relação ao controle nas primeiras 24 horas de observação. A N-acetil- β -glucosaminidase é considerada um marcador muito sensível de alteração tubular renal (17). A excreção dessa enzima lisossomal é relativamente constante com variações diurnas mínimas. É estável com alterações

de pH e temperatura. Os testes para sua determinação são sensíveis o suficiente para permitirem diluição da urina (17,18).

Bosomworth et al. (18) estudando ratos com proteinúria induzida por puromicina, concluíram que a NAG pode ser utilizada como uma medida de alteração de função renal e não somente um marcador de lesão. Bazzi et al. (19), estudando a excreção urinária do NAG em pacientes com glomerulonefrite primária, concluíram que a excreção dessa enzima pode ser um teste não-invasivo e facilmente reproduzível para avaliação de dano inicial das células epiteliais tubulares proximais, em estágios precoces de doenças com potencial de progressão.

O tratamento da pancreatite aguda é conservador, sintomático e está baseado na avaliação precoce da severidade da doença, monitorização invasiva de órgãos e sistemas e reposição volêmica adequada nos estágios iniciais da doença (20,21,22). Não há tratamento farmacológico específico direcionado ao mecanismo fisiopatológico subjacente (20). A reposição inadequada de volume não predispõe somente a complicações sistêmicas, e particularmente a insuficiência renal aguda, mas também representa risco para o desenvolvimento de lesão pancreática adicional (23).

Outra medida que tem se mostrado eficaz no manejo da patologia é a Colangiopancreatografia endoscópica retrograda indicada, por exemplo, para retirada de cálculos do ducto biliar em pacientes com pancreatite grave e naqueles com colangite (20). Em pacientes com pancreatite aguda grave utiliza-se a nutrição enteral (em substituição à parenteral) onde há uma taxa menor de infecções, complicações metabólicas (22). Drogas como o octreotide, poderiam ter um efeito benéfico por sua ação sobre os radicais livres e citocinas (24). No entanto, Heinrich et al. (25) publicaram uma análise baseada em evidências do tratamento da pancreatite aguda e concluíram que nenhum dos tratamentos avaliados está recomendado (gabexato, aprotinina, lexipafante, octreotide).

Assim, como não há tratamento específico para a pancreatite aguda, a frutose-1,6-bisfosfato (FBP) poderia ser uma alternativa terapêutica. A FBP já se mostrou útil em modelos experimentais de sepse (26) e a pancreatite aguda já foi apontada como um modelo para aquela patologia (27). Há muitas semelhanças clínicas e fisiológicas em pacientes com choque séptico e naqueles com pancreatite aguda severa. A frequência da sepse severa em formas avançadas de pancreatite aguda pode atingir 70% (28).

Os mecanismos de ação da frutose-1,6-bisfosfato são: 1) preservação do nível celular de ATP (29)- a FBP entraria na células e agiria como intermediário glicolítico capaz de produzir ATP (30), um substrato de alta energia (31); 2) capacidade de quelar cálcio e reduzir o cálcio ionizado proporcionalmente a sua concentração (32,33); 3) ação antiinflamatória (34); 4) ação imunomodulatória (35) e 5) diminuição da produção de radicais livres de oxigênio (36).

De acordo com Zhao et al.(37) estudos em humanos sobre pancreatite aguda têm muitas limitações, devido ao seu curso clínico rápido e severo. Assim, novos tratamentos devem ser realizados primeiros em animais. Todos os modelos de pancreatite devem ser similares à pancreatite humana quanto à estrutura e fisiopatologia, simples, baratos, e ajudar na compreensão da doença humana, incluindo modos de tratamento.

Já foi relatado que não é difícil estabelecer condições morfológicas similares à pancreatite humana, especialmente em pequenos animais, e está bem estabelecido que a ligadura completa ou incompleta do ducto pancreático pode induzir similaridades morfológicas com a pancreatite humana (38,39).

O modelo experimental de pancreatite aguda por ligadura do ducto pancreático assemelha-se à pancreatite aguda biliar (40), principal causa da pancreatite aguda em humanos. Com o objetivo de utilizar uma técnica que fosse o mais semelhante possível à pancreatite biliar, foi escolhida a técnica da ligadura do ducto pancreático. Foram realizados experimentos visando demonstrar a reversibilidade da pancreatite induzida, simulando a desobstrução do ducto (como nos casos em que é realizada a esfínterectomia endoscópica).

REFERÊNCIAS

- 1) Pandol SJ. Acute Pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:538-543.
- 2) Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005;40:1-10.
- 3) Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl):S15-S39.
- 4) Gutierrez MEH, Perez GS, de Gracia CR, Sanchez MJC, Lopez BN. Características y valor pronóstico del fracaso renal agudo en la pancreatitis aguda grave. *Med Clin (Barc)* 2000;115:721-725.
- 5) Tran DD, Oe PL, de Fijter CWH, van der Meulen J, Cuesta MA. Acute renal failure in patients with acute pancreatitis: prevalence, risk factors, and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:1079-1084.
- 6) Kes P, Vicicevic Z, Ratkovic-Gusic I, Fotivec A. Acute renal failure complicating severe acute pancreatitis (letter to the editor). *Nephron* 1996;73:488-489.
- 7) Gupta RJ. Immunohistochemical study of glomerular lesions in acuter pancreatitis. *Arch Path* 1971;92:267-272.
- 8) Werner MH, Hayes DF, Lucas CE, Rosenberg IK. Renal vasoconstriction in association with acute pancreatitis. *Am J Surgery* 1974;127:185-190.
- 9) Fox JG, Sutcliffe NP, Boulton-Jones JM, Imrie CW. Acute pancreatitis and renal cortical necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1990;5:542-544.
- 10) Zhang JX, Dang SC, Qu JG, Wang X Q. Ligustrazine alleviates acute renal injury in an rat model of acute apncreatitis. *World J Gastroenterol* 2006;12(47):7705-7709.
- 11) Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatol* 2005;5:492-500.
- 12) Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Bioch Bioph Acta* 2002;1588:159-164.
- 13) D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:639-643.
- 14) Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol, Dial Transplant* 2003;18:543-551.

- 15) Gatsing D, Garba IH, Adoga GI. The use of lysosomal enzymuria in the early detection and monitoring of the progression of diabetic nephropathy. *Ind J S of Clin Biochem* 2006;42:42-48.
- 16) Da Silva Melo DA, Saciura VC, Poloni JA, Oliveira CS, Filho JC, Padilha RZ, Reichel CL, Neto EJ, Oliverii RM, D'Avila LC, Kessler A, de Oliveria JR. Evaluation of renal enzymuria and cellular excretion as a marker of acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in Wistar rats. *Clin Chim Acta* 2006;373:88-91.
- 17) Skalova S. The diagnostic role of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2005;48:75-80.
- 18) Bosomworth M, Aparicio S, Hay AWM. Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase- A marker of tubular damage? *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:620-626.
- 19) Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Napodano P, Paparella M, D'Amico G. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1890-1896.
- 20) Dambrauskas Z, Punduzius J, Barauskas G. Predicting development of infected necrosis in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2006;42(6):441-449.
- 21) Eckerwall G, Olin H, Andersson B, Andersson R. Fluid and nutritional support during severe acute pancreatitis in the past: What have we learned and how can we do better? *Clin Nutr* 2006;25:497-504.
- 22) Banks P, Freeman ML, and the Practice Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2379-2400).
- 23) Clancy TE, Benoit EP, Ashley SW. Current management of acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2005;9(3):440-452.
- 24) Czako L, Hegyi P, Takacs T, Gog C, Farkas A, Mandy Y, Varga IS, Tislavicz L, Lonovics J. Effects of octreotide on acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *World J Gastroenterol* 2004;10:2082-2086.
- 25) Heinrich S, Schafer M, Rousson V, Clavien P. Evidence-based treatment of acute pancreatitis. A look at established paradigms. *Ann Surg* 2006;243:154-168.
- 26) Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wachter PH, de Oliveira JR. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003;47:35-41.
- 27) Wilson PG, Manji M, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis as a model of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl):51-63.

- 28) Machala W, Wachowicz N, komorowska A, Gaszynski W. The use of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis during acute pancreatitis-two cases study. *Med Sci Monit* 2004;10(7):CS31-36.
- 29) Gregory GA, WELSH fa, Yu ACH, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. *Brain Res* 1990;516:310-312.
- 30) Lazzarino G, Nuutinen ME, Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, Giardina B. Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated Langendorff-perfused rat hearts. *J Moll Cell Cardiol* 1991;23:13-23.
- 31) Farias LA, Sun J, Markov AK. Improved brain metabolism with fructose-1,6-diphosphate during insulin-induced hypoglycemic coma. *Am J Med Sci* 1989;297:294-299.
- 32) Hassinen IE, Nuutinen M, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, Chance B. Mechanism of the effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation* 1991;83:584-593.
- 33) Aiub CAF, Bortolini R, Azambuja AA, Alves Filho JCF, Nunes FB, de Oliveira JR. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2003;25:83-91.
- 34) Cuesta E, Boada J, Calafell R, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Fructose-1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Crit Care Med* 2006;34:807-814.
- 35) Nunes FB, Grazziontin CM, Alves Filho JCF, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, de Oliveira JR. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Intern Immunopathol* 2003;3:267-272.
- 36) ParkJY, Kim EJ, Kwon KJ, Jung YS, Moon CH, Lee SH, Baik EJ. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res* 2004;1026:295-301.
- 37) Zhao YQ, Liu XH, Ito T, Qian JM. Protective effects of rhubarb on experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10(7):1005-1009.
- 38) Orda R, Hadas N, Orda S, Wiznitzer T. Experimental acute pancreatitis: inducement by taurocholate sodium-trypsin injection into temporarily closed duodenal loop in the rat. *Arch Surg* 1980 Mar;115:327-329.
- 39) Satake K, Miura A. A new model for pancreatitis. *Pancreas* 1998;16(3):284-288.
- 40) Chan TC, Leung PS. Acute pancreatitis Animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007;34(1):1-14.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato sobre as alterações renais associadas à pancreatite aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato sobre os níveis sanguíneos de radicais livres na pancreatite aguda;
- b) avaliar a reversibilidade da pancreatite aguda através do desenvolvimento de modelo experimental de obstrução temporária do ducto pancreático.

3 ARTIGO 1

Experimental acute pancreatitis-associated acute renal failure can be prevented by fructose-1,6-bisphosphate

INTRODUCTION

In severe acute pancreatitis (SAP) necrosis at the site of inflammation and remote organ failure develop in the course of disease (1,2). The mortality rate in SAP is still high, up to 20%(3). In the setting of acute pancreatitis, acute renal failure (ARF) may be due to decreased renal perfusion pressure, as seen in hypotension and hypovolemia, or may be the result of acute tubular necrosis (3). ARF is known to occur within a few days from onset in spite of satisfactory resuscitation. Need for renal replacement therapy is also associated with a high mortality rate (75%-85%) (4,5,6,7). Risk factors associated with its development include underlying chronic disease, hypovolaemia with decreased renal bloodflow, intravascular coagulation, cytotoxic effects of vasoactive substances, and systemic infection (8). Thus, exact pathogenesis of ARF in patients with acute pancreatitis is unclear. As there is no specific treatment to acute pancreatitis, we decided to study the effects of fructose 1,6-bisphosphate (FBP) renal injury associated with it. FBP protects organs and tissues against injuries induced by hypoxia, ischemia, and toxic agents (9). Experimental evidence indicates that the protective action of FBP in stress situations is mediated by its incorporation as an energy substrate, maintaining the energy charge (ATP) (10,11) and by prevention of critical alterations on cell membrane function. Improved mitochondrial function, cell membrane stabilization, blockage of the potassium channels (12) and reduced free radical production have been associated with improvement of the metabolic efficiency in the presence of FBP (9).

MATERIAL AND METHODS

-Induction of acute pancreatitis: Male Wistar rats were kept in individual cages, with water and food *ad libitum*, at room with light/dark cycle and room temperature. Anesthesia consisted of intraperitoneal injection of 30 mg/kg of Tiopental. Pancreatitis was induced by pancreatic duct ligation for 12 hours. The animals were sacrificed by decapitation. They were divided in four groups of 6 animals: negative (sham operation), pancreatitis (PL), pancreatitis plus saline solution (PL+sal) and pancreatitis plus FBP solution (PL+FBP). Each gram of FBP (Sigma Chemical Co., Germany) was diluted in 1mL of saline and given in a dose of 500 mg/kg, a corresponding volume of saline was given to the animals, also by intraperitoneal injection, following pancreatic duct ligation and abdominal wall closure. Final infused volumes varied between 0.6 to 0.8mL. In order to evaluate the effect of pancreatic duct manipulation, the sham group undergo laparotomy, pancreatic duct exposure, followed by abdominal wall closure.

-Collection of urine and blood:

Urine: was collected during the 12 h experimental period, the whole volume used for creatinine clearance measurement and a sample for fractional sodium excretion (FENa).

Blood was collected immediately after decapitation, for hematological and biochemical analysis. For the latter, centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature was followed by serum freezing at -20°C .

a) Laboratory specifications:

- **Amylase:** plasma activity was determined in plasma using a modified method of Caraway (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil).
- **Hematocrit:** was determined by Coulter CBC 25
- **Serum and urinary creatinine:** were determined using a colorimetric method with an end point reaction (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil).
- **Serum sodium-** it was determined by flame spectrophotometry

Fractional sodium excretion formula:

$$\frac{\text{urine sodium (mEq/L)} \times \text{serum Creatinine (mg/dL)}}{\text{serum sodium (mEq/L)} \times \text{urine Creatinine (mg/dL)}} \times 100$$

$$\frac{\text{urine sodium (mEq/L)}}{\text{serum sodium (mEq/L)}} \times \frac{\text{urine Creatinine (mg/dL)}}{\text{serum Creatinine (mg/dL)}} \times 100$$

Endogenous creatinine clearance:

$\frac{\text{urine volume (ml)} \times \text{urine Creatinine(mg/dL)}}{\text{serum creatinine (mg/dL)} \times \text{time (minutes)}}$

serum creatinine (mg/dL) X time (minutes)

b) **Statistical analysis:** The statistical analysis was carried out using the SPSS 11.0 for Windows. Results were expressed as means \pm SD. Analysis of variance (ANOVA) followed by LSD test was used for comparisons among groups in each experiment.

The study protocol was reviewed and approved by the institution scientific and ethics committees (Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

RESULTS

Serum amylase increased in every animal submitted to ligation of the pancreatic duct. Neither FBP nor saline were able to prevent it (figure 1).

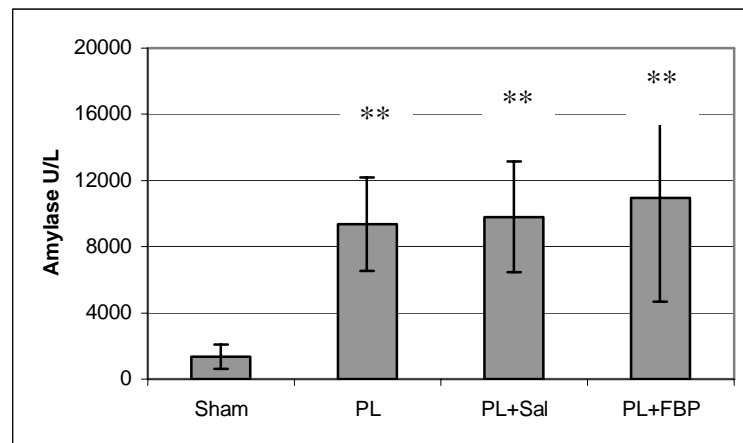


Figure 1 - Amylase serum levels increase after pancreatic duct ligation is depicted: sham 1347.59 \pm 744.80 U/L; PL 9364.35 \pm 2819.35 U/L; PL+ saline 9803.92 \pm 3341.99 U/L, PL + FBP 10954.36 \pm 6269.48 U/L (** P < 0.001).

Hematocrit levels increased after pancreatic duct ligation. This was, however, prevented by both saline and FBP administration (figure 2).

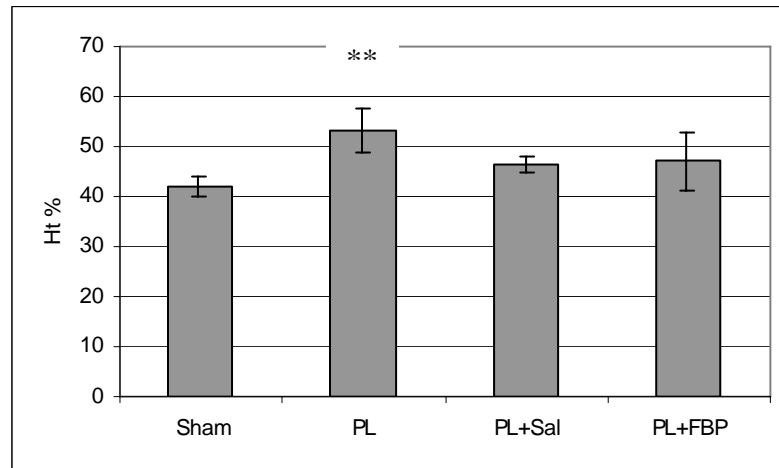


Figure 2 - hematocrit after PL is depicted: sham 41.97 ± 1.87 %; PL 53.22 ± 4.33 %; PL+saline 46.57 ± 1.59 % and PL+fructose 47.01 ± 5.72 %, **($P < 0.01$)

Urine volume decreased after pancreatic duct ligation. This was prevented either by FBP or saline administration. In fact, the latter produced an increased urine output (figure 3)

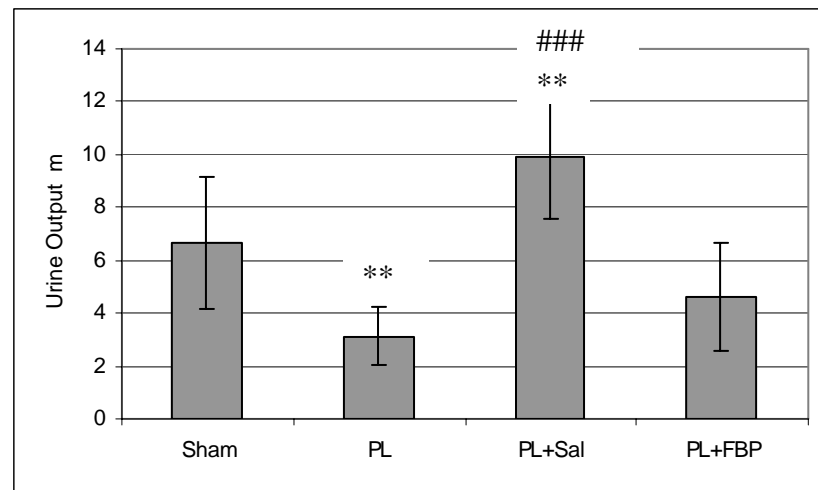


Figure 3 - Twelve hours urine volume observed after PL and either no treatment or FBP or saline infusion; ** represents difference between sham and PL or saline ($P < 0.01$); ### represents difference between PL+saline and all other groups ($P < 0.001$): sham 6.65 ± 2.49 mL; PL 3.12 ± 1.09 mL; PL + saline 9.92 ± 2.36 mL and PL + fructose 4.63 ± 2.04 mL.

Fractional sodium excretion increased after pancreatic duct ligation, especially after saline administration. It was, however, prevented by FBP (figure 4).

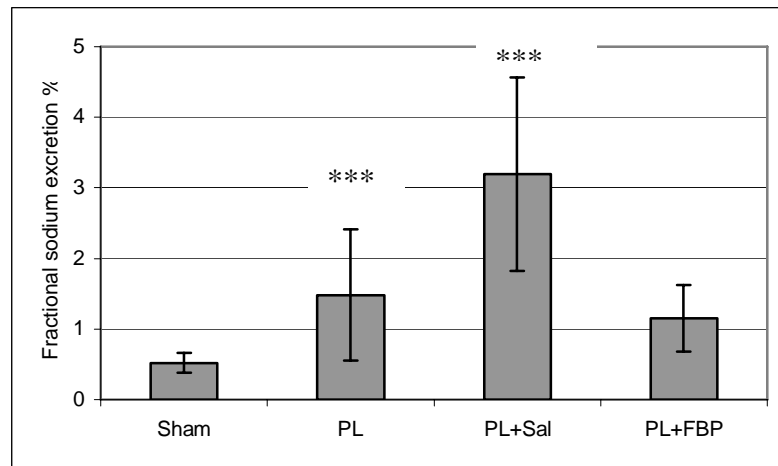


Figure 4 - Fractional sodium excretion after PL and either no treatment or saline or FBP infusion; *** represents difference between PL or PS+saline and sham ($P < 0.001$): sham 0.52 ± 0.14 %; PL 1.48 ± 0.93 %; PL + saline 3.19 ± 1.37 % and PL + fructose 1.15 ± 0.47 %.

Pancreatic duct ligation was associated with a marked fall in glomerular filtration rate, prevented by FBP but not by saline administration (figure 5).

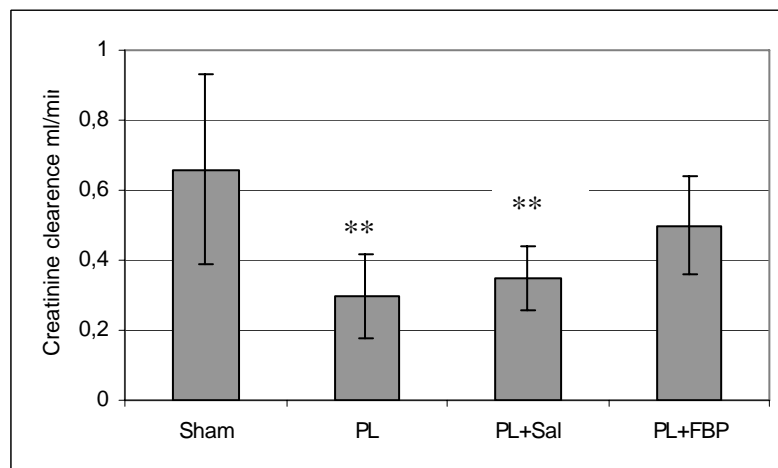


Figure 5 - Effect of main pancreatic duct ligation and treatment with saline or FBP on creatinine clearance. The significant differences between PL, PL + Saline and sham are represented by ** ($P < 0.01$): sham 0.66 ± 0.27 mL/min; PL 0.30 ± 0.12 mL/min; PL + saline 0.35 ± 0.09 mL/min and PL+ fructose 0.50 ± 0.14 mL/min.

DISCUSSION

Fructose-1,6-bisphosphate has been demonstrated to preserve kidney function in organ storage (13). In pancreatitis, however, it has not been investigated yet.

We chose pancreatic duct obstruction model because, it mimics gallstone obstruction-induced acute pancreatitis (14), a major cause of human acute pancreatitis. Twelve-hour obstruction seems to induce higher blood levels of free radicals, hematocrit and serum amylase as well as TNF- α (15,16). Pancreatic tissue edema seems to be more severe after this time-period. (15)

In the present study an increased hematocrit level was observed after pancreatic duct ligation. Such an increase was prevented by administration of either saline or fructose-1,6-bisphosphate, suggesting that hemoconcentration may underlie such abnormality. In accordance, urine volume has decreased after pancreatic duct ligation, and this was again prevented by either saline or fructose-1,6-bisphosphate IP administration. In fact, the former induced an increase in urine volume, compared to control animals. These results suggest that volume control regulation is impaired after pancreatic duct ligation. Such dysregulation could be restored after fructose-1,6-bisphosphate infusion.

To test this hypothesis, we measured fractional sodium excretion (FENa). This parameter increased after pancreatitis induction, especially when such a procedure was accompanied by saline infusion. No abnormality in sodium excretion was seen when pancreatic duct ligation was performed in conjunction with fructose-1,6-bisphosphate infusion. These observations, suggest that fructose-1,6-bisphosphate prevents tubular damage associated with acute pancreatitis. The FENa is a clinically accurate screening test to differentiate between pre-renal disease and acute tubular necrosis (ATN), the two most common causes of acute renal failure in humans. In a review of the literature undertaken for this study no reference values were found for rats. In our study, the sham group had a FENa of 0.52%, while animals with pancreatitis had a FENa of 1.48%. Treatment with saline solution, besides proving incapable of preventing this alteration, led FENa to reach a value over 3%. Although administration of saline solution restored blood volume, as demonstrated by a decrease in the hematocrit it did not lead to normalization of the FENa, strongly

suggesting that the latter alteration was due to ATN. However, with FBP, which also impeded the elevation in the hematocrit, FENa was restored, suggesting a protective effect on the tubular renal lesion induced by the acute pancreatitis. The values found in the present study strengthen the role of ATN as a renal alteration mechanism in AP. Of note, sodium load was greater in the group treated with FBP than in the group receiving saline (as the former contains about 31.9 mg of sodium per treatment and the former about 2.4 mg of sodium per treatment). Despite this overload, the FBP treated group had a normal FENa value. This finding clearly makes protective effect of the FBP plain.

We further assessed glomerular filtration rate, as measured by the creatinine clearance, aiming to improve our understanding on renal alterations on this model of acute pancreatitis, as well as on the mechanisms of action of fructose-1,6-bisphosphate. A reduction in glomerular filtration rate was demonstrated in animals with acute pancreatitis, and this was prevented by fructose-1,6-bisphosphate administration, but not by an equivalent volume of saline.

Based on the present findings, it seems that fructose-1,6-bisphosphate is able to prevent severe pancreatitis associated acute renal failure. Putative mechanisms (as demonstrated for other tissues) include anaerobic metabolism of FBP yielding ATP or stimulation of glycolysis, buffering of intracellular pH changes, binding of extracellular calcium and reduction of the amount of calcium available to enter and damage cells, limiting superoxide and H₂O₂ production by activated neutrophils, preservation of cells morphology as well as critical alterations in cell membrane functions (9, 10, 11,17,18,19). As the exact mechanism by which fructose-1,6-bisphosphate prevents the emergence of acute tubular necrosis is not clear, further studies become necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Melissa Guerra Simões Pires for excellent assistance with statistics.

LIST OF ABBREVIATIONS (in order of appearance)

SAP - severe acute pancreatitis
 ARF - acute renal failure
 FBP - fructose-1,6-bisphosphate
 FENa - fractional sodium excretion
 ATN - acute tubular necrosis

REFERENCES

- 1) Weber CK, Adler G. Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2003;19:447-450.
- 2) Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003;361:1447-1455.
- 3) Tooli J, Brook-Smith M, Bassi C et al. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(suppl):S15-S39.
- 4) Eckerwall G, Olin H, Andersson B, Andersson R. Fluid resuscitation and nutritional support during severe acute pancreatitis in the past: what have we learned and how can we do better? *Clin Nutr* 2006 Jun;25(3):497-504.
- 5) Gutierrez MEH, Pérez GS, Gracia CR, Sanchez MJC, López BN. Características y valor pronóstico del fracaso renal agudo en la pancreatitis aguda grave. *Med Clin (Barc)* 2000:721-725.
- 6) Takase K, Takeyama Y, Nishikawa J et al. Apoptotic cell death of renal tubules in experimental acute pancreatitis. *Surgery* 1999;125:411-20.
- 7) Kes P, Vucicevic Z, Ratkovic-Gusic I, Fotivic A. Acute renal failure complicating severe acute pancreatitis. *Nephron* 1996;73:488-489.
- 8) Tran DD, Oe PL, de Fijter WH, van der Meulen J, Cuesta MA. Acute renal failure in patients with acute pancreatitis: prevalence, risk factors, and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:1079-1084.
- 9) Cuesta E, Boada J, Calafell R, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Crit Care Med* 2006 Mar;34(3):807-14.

- 10) Aiub CAF, Bortolini R, Azambuja AA, Alves Filho JCF, Nunes FB, de Oliveria JR. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2003;25:83-91.
- 11) Wheeler TJ, Wiegand CB, Chein S. Fructose-1,6-bisphosphate enhances hypothermic preservation of cardiac myocytes. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1378-1384.
- 12) Nunes FB, Alves Filho JCF, Bastos CMA et al. Effect of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate on soluble TNF receptor II levels. *Pharmacol Res* 2004;49:449-453.
- 13) Antunes N, Martinusso CA, Takiya CM et al.. Fructose-1,6 diphosphate as a protective agent for experimental ischemic acute renal failure. *Kidney Intern* 2006;69:68-72.
- 14) Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis. Animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007;34(1):1-14.
- 15) Uruñuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Bioch Biophys Acta* 2002;1588:159-164.
- 16) de Dios I, Perez M, de la Mano A et al. Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction –induced acute pancreatitis in rats. *Cytokine* 2002;20(6):295-303.
- 17) Vexler ZS, Wong A, Francisco C et al. Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress. *Brain Res* 2003;960:90-98.
- 18) Park J, Kim EJ, Kwon KJ et al. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res* 2004;1026:295-301.
- 19) Moresco RN, Santos RCV, Alves Filho JCF, de Oliveira JR. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution after 12 and 36 hours of rat liver preservation. *Transplant Proc* 2004;36:2593-2595.

4 ARTIGO 2

Effects of fructose-1,6-bisphosphate on urinary enzyme activity and serum free-radicals production associated with severe acute pancreatitis

INTRODUCTION

Acute renal failure (ARF) developed during an episode of acute pancreatitis carries a high morbidity and mortality (1,2). According to Gutierrez et al.(2), the prerenal etiology to the ARF is decreasing. Shi et al. (3), in a review about the role of reactive oxygen species in acute pancreatitis concluded that ROS are a critical factor in the development of pancreatitis-induced remote organ dysfunction. So, ROS could be one of the possible etiologies for ARF in acute pancreatitis.

The kidney function can be assessed by a number of methods. The urinary excretion of enzymes has been used for the detection of small changes in the function of tubular epithelial cells (4). N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) is an important marker of tubular damage because it is sensitive enough to allow dilution of urine (5) and is considered a relatively simple, cheap, fast and non-invasive method in the detection of renal tubular function under various conditions (6).

It has been demonstrated that fructose-1,6-bisphosphate (FBP) was a protective agent of renal cell damage secondary to ischemia (7). As demonstrated by Park et al. (8), FBP can reduce ROS production. So, we postulate that FBP can prevent the renal damage induced by acute pancreatitis. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination was used as a marker of lipid peroxidation. This is initiated as a result of free radical formation and maintains the generation in a chain reaction that ultimately damages the cell membrane (9).

MATERIALS AND METHODS

- a) **Induction of acute pancreatitis:** Male Wistar rats were kept in individual cages, with water and food *ad libitum*, at room with light/dark cycle and room temperature. Anesthesia consisted of intraperitoneal injection of 30 mg/kg of Tiopental . Pancreatitis was induced by pancreatic duct ligation for 12 hours. The animals were sacrificed by decapitation. They were divided in four groups: negative (sham operation), pancreatitis (PL), pancreatitis plus saline solution(PL+sal) and pancreatitis plus FBP solution (PL+FBP).Five hundred mg/kg of FBP (Sigma Chemical Co., Germany) or a corresponding volume of saline were given to the animals, also by intraperitoneal injection, following pancreatic duct ligation and abdominal wall closure. Final infused volumes varied between 0.6 to 0.8mL. In order to evaluate the effect of pancreatic duct manipulation, the sham group undergo laparotomy, pancreatic duct exposure, followed by abdominal wall closure;
- b) **Collection of urine and blood:** Urine: was collected during the 12 h experimental period, the whole volume used for NAG measurement. Blood was collected immediately after decapitation, for TBARS and creatinine measurements. For the latter, centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature was followed by serum freezing at -20°C .

Laboratory specifications:

- a) **NAG** - was determined by an enzymatic, colorimetric method (10);
- b) **Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay** - samples were heated with thiobarbituric acid (TBA) 0.67% and trichloroacetic acid (TCA) for 15 minutes in boiling water-bath. The product was extracted with butanol, and analysed by spectrophotometry in 535 nm (Espectronic Genesys IM8).(11);
- c) **Renal histology-** renal sections were stained with hematoxylin and eosin. They were examined in blind fashion by the pathologist.

Statistical analysis: The statistical significance analysis was carried out using the SPSS 11.0 for Windows. Results were expressed as means \pm SD. Analysis of

variance (ANOVA) followed by LSD test was used for comparisons among groups in each experiment.

The study protocol was reviewed and approved by the institution scientific and ethics committees (Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

RESULTS

Urinary NAG increased in every group submitted to ligation of the pancreatic duct, especially in the PL + Sal group. This was not prevented by FBP administration. In the latter group, urinary NAG levels are similar to the sham and PL groups.

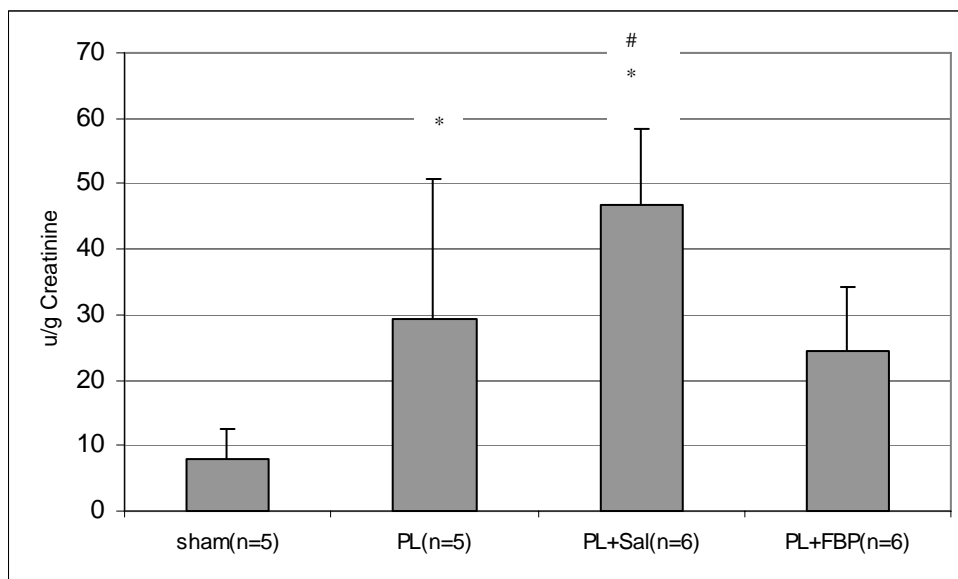


Figure 1 - Urinary NAG after PL is depicted. * represents difference among sham PL and PL + Sal group ($P \leq 0,03$); # represents difference between PL + Sal and PL +FBP ($P = 0,017$): sham 7.92 ± 4.63 U/g creatinine; PL 29.32 ± 21.31 U/g creatinine; PL + Sal 46.67 ± 11.82 U/g creatinine and PL+FBP 24.54 ± 9.64 U/g creatinine.

Pancreatic duct ligation was associated with increased TBARS blood levels, especially after saline administration. FBP infusion did not prevent TBARS rise associated with acute pancreatitis.

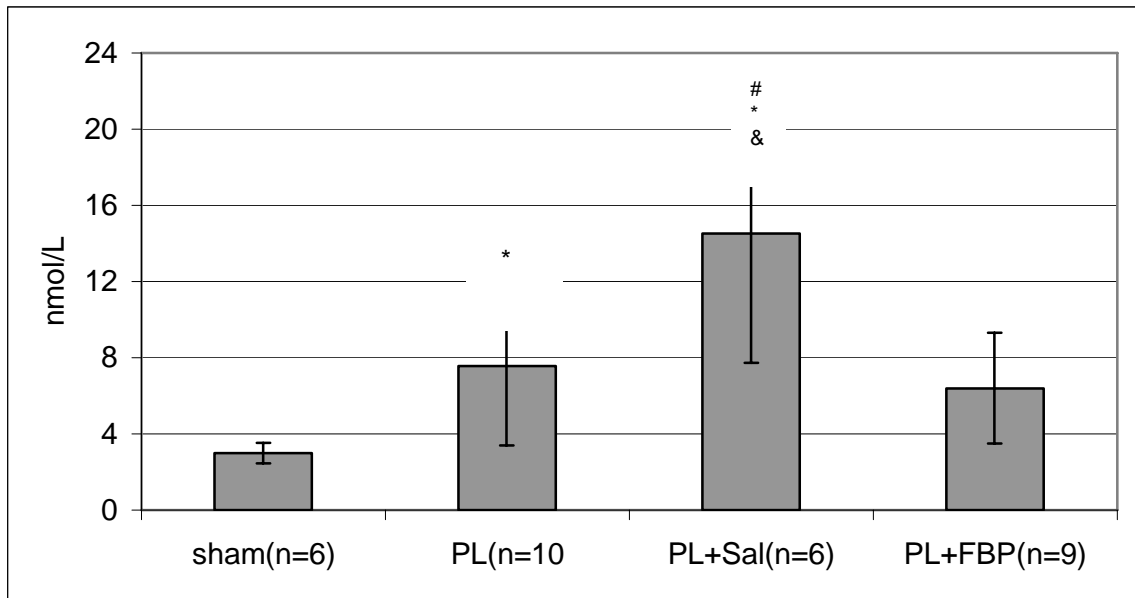


Figure 2 - TBARS levels observed after pancreatic duct ligation and either no treatment or Saline or FBP infusion; * represents difference between PL, PL+Sal and sham groups ($P \leq 0,04$); & represents difference between PL + Sal and PL group ($P=0,038$) and # represents difference between PL + Sal group and PL+FBP group ($P=0.001$).: sham 2.99 ± 0.53 nmol/L ; PL 7.56 ± 4.15 nmol/L; PL+Sal 14.52 ± 6.79 nmol/L ; PL+FBP 6.40 ± 2.91 nmol/L.

The histological analysis of the rat kidneys of all groups showed no alterations (figure 3).

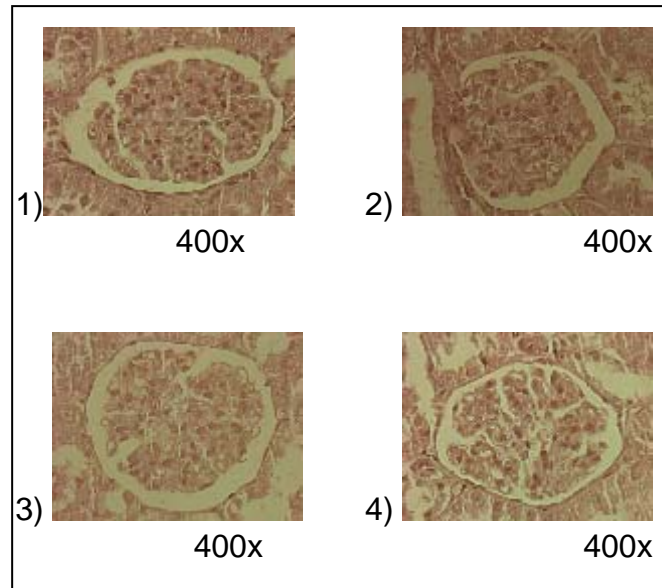


Figure 3 - shows the glomerulus of the 4 groups. None of them shown any alteration: 1) sham; 2) PL; 3) PL+Sal and 4) PL+FBP

DISCUSSION

According to Gutierrez et al (2), in a retrospective study of 154 patients with severe acute pancreatitis, concluded that acute renal failure is a frequent and early complication of this disease, worsening its prognosis and the need of replacement therapy carries a high mortality. To study better the renal alterations secondary to a pancreatic duct ligation model of acute pancreatitis, we chose the NAG urinary level, as a marker of tubular damage.

Bosomworth, Aparicio & Hay (12) studying total protein, albumin, NAG activity and protein electrophoretic pattern in daily urine samples of rats with proteinuria induced by puromycin concluded that NAG reflects altered tubular function and not simply an indicator of damage. We noticed a NAG level increase in pancreatic duct ligation group, suggesting proximal tubular damage. This increase showed to be greater in the PL+ sal group. In the PL + FBP group the rise in NAG levels was not so big. This finding suggests that the volume was not the responsible by FBP protective action, since it and saline were infused in an equivalent volume. The reason to the rising in the saline group has lead us to search for a possible pathophysiologic

mechanism to it. We noticed in the PL group that the NAG results had a great variability. We performed another measurement in the same group with the same result. We can assume that there is a tendency to a decrease of NAG activity in PL+FBP group but further experiments will be necessary to clarify this issue. Further experiments were carried out to clarify this issue.

It was already stated that ROS have a role in the pathogenesis and progression of acute pancreatitis (13). So, we proceeded with other experiments to measure TBARS levels since TBARS assay is one of the commonly used methods for the measurement of free radical reactions indirectly (9). We noticed that, in parallel with an increase in NAG levels there was also an increase in TBARS. The same findings to NAG were reproduced with TBARS.

It is important to note the increase in NAG and TBARS levels in the PL+saline group. A possible mechanism would be through the re-oxygenation after ischemia/reperfusion insult. Singh & Chopra (14) demonstrated that renal ischemia/reperfusion (I/R), in a rat model, caused an increase in the renal TBARS levels and that renal I/R induced oxidative stress was associated with impaired renal function. Pretreatment with trimetazidine (a cellular anti-ischemic agent with potent antioxidant activity on various tissue preparations) prevented the renal I/R induced lipid peroxidation and protected the severe depletion of antioxidant enzyme pool in the renal I/R treated rats. Doi et al. (15) studying the effects of a drug named edaravone (a potent scavenger of free radicals and has the antioxidant ability to inhibit lipid peroxidation) on renal oxidative stress in a rat ischemia/reperfusion model demonstrated that the drug ameliorates renal ischemia/reperfusion lesion by scavenging free radicals produced in renal tubular cells. Noor et al. (9) studying the same drug in hypoxic/ischemic brain damage of neonatal rats demonstrated that the drug significantly decreased TBARS levels in a time period after hypoxia compared with the saline group (TBARS levels increased in the saline group). Sener et al (16) studying the resveratrol (present, for example, in red wine) a potent antioxidant, in a rat model of I/R injury demonstrated that the compound reduces renal I/R injury and that the protective effect can be attributed, at least in part, to its ability to balance oxidant-antioxidant status. Using the same idea to our renal lesion model, it can be postulated that saline infusion would ameliorate renal perfusion with an increase in ROS levels. This increase in ROS would be the responsible for a bigger tubular cells

lesion (expresses by NAG levels). The administration of FBP, know to have an effect over ROS, would prevent these to damage tubular cells.

The histological analysis of the kidneys of the rats showed no alterations among all groups indicating that, in a 12-h duct ligation period, we can induce an alteration in renal function without a corresponding histological lesion. Bosomworth, Aparicio & Hay (5), in the study mentioned above about NAG activity, found that in a group of rats with histologically normal tubules there was a significant correlation between urine total protein and urine NAG activity (in the group with histologically abnormal tubules this correlation was even more pronounced). This finding reassert the idea that NAG is a marker of tubular dysfunction.

We conclude that the mechanisms underlying renal dysfunction after 12-h pancreatic duct ligation, as assessed by NAG, are related to oxidative stress (as suggested by TBARS blood levels and a concomitant increase in urine NAG levels). FBP was not capable of preventing NAG and TBARS increase after pancreatic duct ligation. However it may protect tubular cells, especially in the ischemia/reperfusion setting. Further studies are necessary to clarify these issues.

REFERENCES

- 1) Kes P, Vucicevic Z, Ratkovic-Gusic I, Fotivec A. Acute renal failure complicating severe acute pancreatitis. *Nephron* 1996;73:488-489.
- 2) Gutierrez MEH, Perez GS, de Gracia CR, Sanchez MJC, Lopez BN. Características y valor pronóstico del fracaso renal agudo en la pancreatitis aguda grave. *Med Clin (Barc)* 2000;115:1079-1084.
- 3) Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 2005;5:492-500.
- 4) D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:639-643.
- 5) Bosomworth M, Aparicio S, Hay AWM. Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase- A marker of tubular damage? *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:620-626.

- 6) Skalova S. The diagnostic role of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2005;48:75-80.
- 7) Antunes N, Martinusso CA, Takiya CM, da Silva AJR, de Ornellas JFR, Elias PR, Leite Jr M, Cardoso LR. Fructose-1,6-diphosphate as a protective agent for experimental ischemic acute renal failure. *Kidney International* 2006;69:68-72.
- 8) Park J, Kim EJ, Kwon KJ, Jung YS, Moon CH, Lee SH, Baik EJ. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res* 2004;1026:295-301.
- 9) Noor JI, Ikeda T, Ueda Y, Ikenoue T. A free radical scavenger, edaravone, inhibits lipid peroxidation and the production of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain damage of neonatal rats. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1703-1708.
- 10) Marunh D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 1976;73:453-461.
- 11) Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990;186:421-431.
- 12) Bosomworth M, Aparicio S, Hay AWM. Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase- A marker of tubular damage? *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:620-626.
- 13) Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002;1588:159-164.
- 14) Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res* 2004;50:623-629.
- 15) Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Noiri E. Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney International* 2004;65:1714-1723.
- 16) Sener G, Tugtepe H, Yuksel M, Cetinel S, Gedik N, Yegen BÇ. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res* 2006;37:822-829.

5 ARTIGO 3

Ligadura reversível do ducto pancreático: descrição de uma técnica clinicamente relevante.

INTRODUÇÃO

A pancreatite representa uma patologia potencialmente letal para a qual não há tratamento específico (1) Estudos controlados randomizados, sobre a pancreatite aguda humana podem ser realizados somente com restrições e, no mínimo, alguns aspectos de novos tratamentos devem ser primeiro testados em animais de experimentação (2). Entre os aspetos que dificultam esses estudos estão: a variação nas causas, os graus de severidade e o curso da doença. O início da doença (geralmente referido como o surgimento de dor abdominal) não pode ser determinado com exatidão. A localização anatômica do pâncreas no retroperitônio torna o órgão quase inacessível para investigações mais detalhadas (2). Assim, os estudos em animais tornam-se necessários. Há vários modelos de pancreatite aguda experimental, como exemplificado na tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de modelos de pancreatite aguda experimental - modificado de Chan & Leung (3)

MODELO	ANIMAIS
Dieta deficiente em colina / suplementada em etionina	Camundongo
Arginina	Ratos, camundongos, coelhos
Ceruleína	Camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos
Vascular-induzida	Ratos, cães, gatos, porcos
Alça duodenal fechada	Ratos, cães, macacos
Induzida por ligadura do ducto pancreático	Ratos, cães, gambás
Induzida por infusão no ducto	Ratos, coelhos, cães, porcos

De acordo com Chan e Leung (3) o modelo de ligadura do ducto pancreático mimetiza a pancreatite aguda biliar, principal causa em humanos. Segundo o estudo de Osvaldt et al. (4), realizado em nosso meio, a etiologia biliar foi responsável por 78% dos casos de pancreatite aguda atendidos (4). A manipulação é simples, requerendo ligadura do ducto biliopancreático ou obstrução do mesmo por canulação ou inserção de um cateter com balão (3).

A utilização de um modelo que reproduza ao máximo os eventos fisiopatológicos da pancreatite aguda em humanos, deve também permitir abordagens terapêuticas semelhantes às utilizadas em humanos.

No caso da pancreatite aguda de origem biliar com evolução desfavorável, a esfínterectomia endoscópica e conseqüente descompressão da via biliar já tem seu lugar no manejo da patologia. Geralmente o procedimento é realizado dentro de 72 horas após admissão dos pacientes (5,6). Nos modelos experimentais, o equivalente à esfínterectomia endoscópica seria a reversão da obstrução do ducto pancreático. Siech et al. (7) ligaram o ducto pancreático principal com um *clip* e o removeram após determinado tempo e injeção de colecisticinina.

Kaiser et al. (8) realizaram a obstrução do ducto de modo intermitente, com o uso de um balão extraductal. O animal utilizado no experimento foi o gambá americano. Farkas et al. (9) utilizaram-se de cânula, clampe e nó sobre a cânula, que era desfeito após o tempo determinado para o estudo. Kruse et al. (10) também fizeram uso de um clampe e houve a injeção de taurocolato.

No entanto, faz-se mister algumas críticas a estes trabalhos: apesar de ter havido liberação da oclusão do ducto pancreático (DP) (o que equivaleria à esfínterectomia endoscópica), não há relatos sobre reversão do processo; em alguns modelos houve a injeção de substâncias que não fazem parte da gênese da pancreatite aguda em humanos.

Como citado por Orda et al. (11) e Satake et al. (12) os modelos de pancreatite devem ser simples e baratos. A procura por um modelo com essas características nos levou à realização deste trabalho. A utilização de *clips* e clampes e a necessidade de manipulação do ducto pancreático não preenchem, segundo nossa ótica, esses critérios. Isto nos levou a procurar um modelo que preenchesse os requisitos acima, norteando-nos por modelos já estabelecidos e de uso corrente na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, anestesia

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos. Os mesmos foram alojados em caixas individuais, com água e ração *ad libitum*, ciclo claro/escuro, temperatura ambiente. Os animais foram anestesiados com Tiopental, injetado por via intraperitoneal, na dose de 30mg/kg e colocados em posição supina em mesa apropriada com fixação dos quatro membros.

- Indução da pancreatite aguda

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle manipulado (*sham*) (n=6; laparotomia, exposição sem oclusão do ducto pancreático principal), grupo oclusão 12 h (n=6; oclusão do ducto pancreático (DP) por 12 horas e morte dos animais), grupo reversão 24 h (n=12; oclusão do ducto pancreático por 12 horas e morte após 24 horas da reversão), grupo reversão 48 h (n=10; oclusão do ducto pancreático por 12 horas e morte após 48 horas da reversão).

Os animais, com exceção do grupo *sham*, foram submetidos a procedimento cirúrgico como se segue: o primeiro passo, após anestesia, foi a laparotomia por meio de incisão na linha média, no abdômen superior, com cerca de 1,5 cm de extensão. A localização do DP e oclusão do mesmo foram o mais próximo possível da parede duodenal. A oclusão era realizada com um fio seda 3-0 amarrado com um nó sobre segmento de cateter de oxigênio número 14 (segmento de cateter com 0,5cm) conforme ilustrado na figura 1.

A parede abdominal foi suturada com fio Mononylon 3-0. A oclusão foi desfeita após 12 horas do procedimento inicial, com secção do fio com bisturi, usando o segmento de cateter como apoio. Nos casos em que havia a presença de líquido de ascite, era coletada alíquota de 1ml, através de pipeta automática.

Todos os animais foram eutanasiados por meio de decapitação

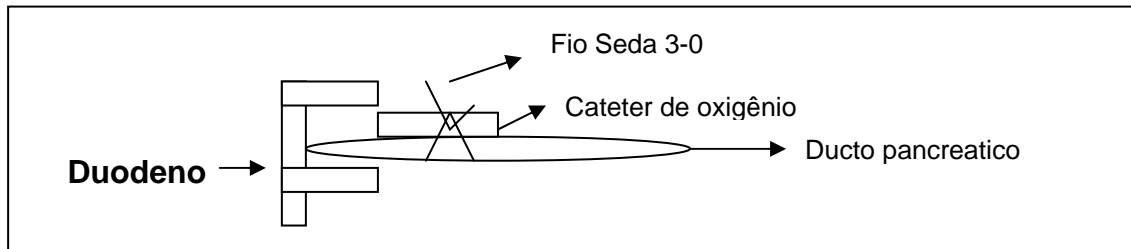


Figura 1 - Modelo esquemático da ligadura do ducto pancreático principal (DPP)

- a) Coleta de sangue, material para análise histológica
 - Sangue - após a decapitação dos animais, o sangue foi coletado imediatamente para análise hematológica e bioquímica.
- b) Determinações laboratoriais
 - Amilase - atividade plasmática foi determinada utilizando-se o método de Caraway modificado (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil);
 - Hematócrito: determinado através do Coulter CBC 25-.

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa SPSS 11.0 for Windows. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. A análise da variância, seguida pelo teste LSD, foi utilizada para comparação entre os grupos.

O estudo foi aprovado pelos Comitês Científicos e de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

O tempo médio para a realização dos procedimentos, tanto da primeira quanto da segunda laparotomia, foi de 10 minutos após posicionamento dos animais já anestesiados. Não foram registrados acidentes de punção (punção de alças, injeção no subcutâneo) com o anestésico.

Houve elevação do valor da amilase no grupo onde foi realizada somente a oclusão do ducto pancreático. O valor da amilase regride depois de realizada a reversão da ligadura (figura 2).

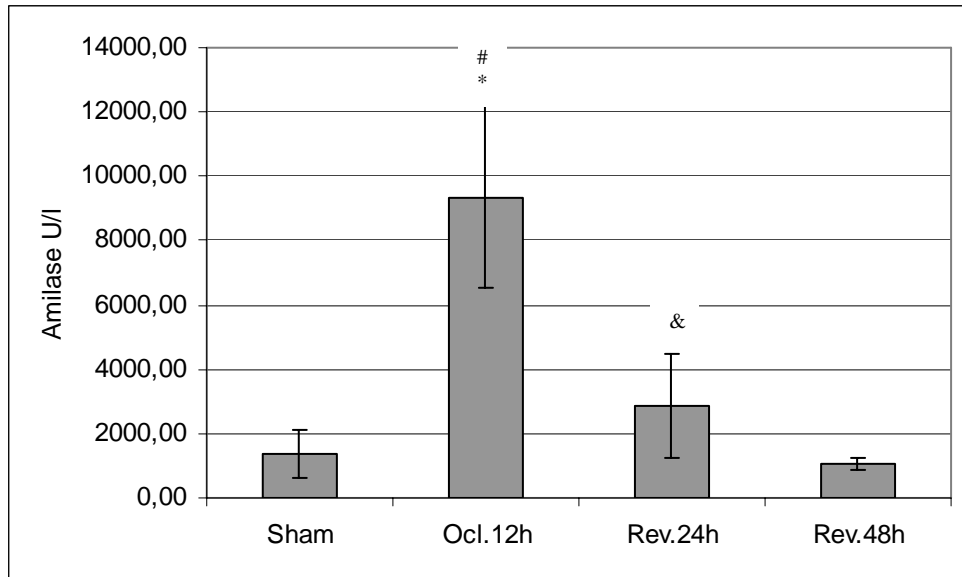


Figura.2- Efeito da ligadura do ducto pancreático e sua reversão sobre os valores da amilase: sham=1347,57±744,82 U/l; Oclusão 12 horas(Ocl.12h)=9364±2819,35U/l; Revertido 24 horas(Rev.24h)=2877,25±1612,39 U/l; Revertido 48h(Rev.48h)=1062,50±162,09 U/l (* indica diferença estatística em relação ao grupo sham P<0,001; # indica diferença estatística com os demais grupos P<0,001; & indica diferença estatística em relação ao grupo Rev.48 P=0,047)

Houve aumento do valor do hematócrito no grupo onde foi realizado oclusão do ducto pancreático. O valor do hematócrito mostra decréscimo depois de retirada a ligadura (fig.3).

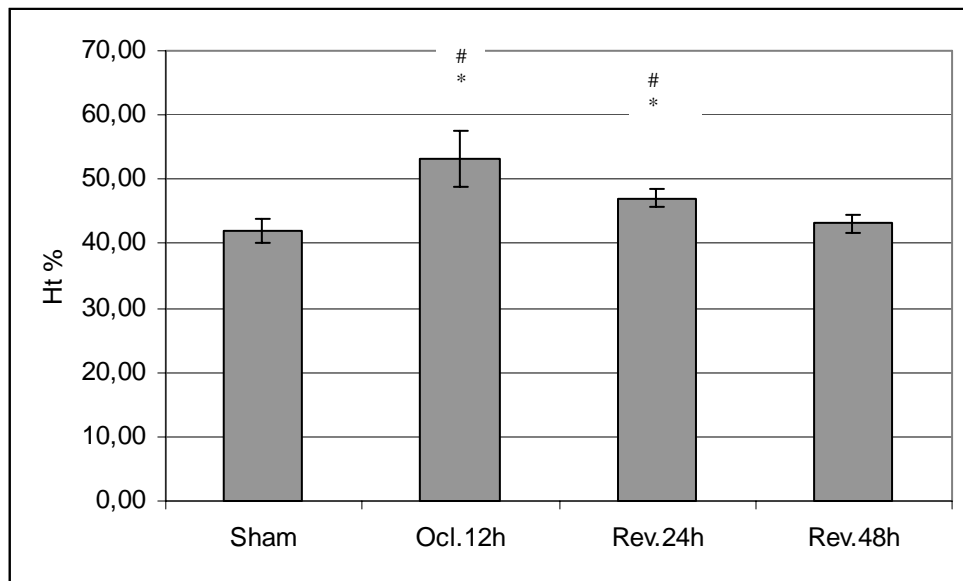


Figura 2 - Efeito da ligadura e reversão da mesma sobre os valores do hematocrito: sham= $41,97 \pm 1,87$ %; Oclusão 12 horas (Ocl.12h)= $53,22 \pm 4,33$ %; Revertido 24 horas (Rev.24h)= $47,08 \pm 1,38$ %; Revertido 48 horas (Rev.48h)= $43,1 \pm 1,45$ % (* indica diferença significativa em relação ao grupo sham $P < 0,001$; # indica diferença estatística em relação aos demais grupos com $P \leq 0,001$)

DISCUSSÃO

O modelo de pancreatite aguda, por oclusão ductal, tem seu foco na etiologia da pancreatite aguda, biliar na sua maioria, e tem grande relevância clínica (3,4). Alguns modelos de oclusão do ducto pancreático utilizam materiais de alto custo, como clampes e cateteres com balão, o que torna o procedimento pouco acessível.

O modelo aqui apresentado segue os mesmos princípios desses modelos, porém utilizando material de baixo custo. A técnica é de baixa complexidade e execução relativamente rápida, conforme demonstrado pelo tempo de execução médio de 10 minutos após anestesia.

A determinação da amilase sérica é o teste mais comumente utilizado para o diagnóstico de pancreatite aguda (13). A elevação da amilase a níveis com significância estatística em relação ao grupo *sham*, demonstra que houve indução de pancreatite aguda e que a mesma foi causada pela oclusão do ducto e não pelo

procedimento cirúrgico. A queda da amilase a valores próximos do basal demonstra a reversibilidade do processo. Tal evento não havia sido demonstrado na literatura revisada. A reversão da ligadura no modelo experimental utilizado procurou reproduzir os eventos que devem ocorrer após uma esfínterectomia endoscópica, ou seja, desfazer a obstrução do ducto pancreático.

Na pancreatite aguda pode haver depleção severa do volume intravascular e, como conseqüência, hipovolemia. Como essa depleção intravascular pode se manifestar como um hematócrito concentrado, foi postulado que a hemoconcentração poderia ser um marcador de pancreatite severa (14). No presente estudo, observou-se uma elevação do hematócrito no grupo submetido somente à ligadura do ducto pancreático. Esse valor apresentou queda progressiva após revertida a ligadura. Segundo Garnder et al. (14), as vantagens de determinar-se o hematocrito são que é uma medida de fácil realização e feita em quase todos os pacientes com pancreatite no momento da apresentação, não é caro, é acurado e reprodutível.

Concluimos que a modificação à técnica aqui apresentada (uso somente de segmento de cateter e fio de sutura) induz pancreatite aguda em animais de experimentação e que a mesma pode ser revertida com êxito. O método é de execução simples, rápida e barata, podendo ser utilizada para o estudo da patologia.

REFERENCIAS

- 1) Pandol SJ. Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:538-543.
- 2) Foitzik T, Hotz HG, Eibel G, Buhr HJ. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? *Int J Colorectal Dis* 2000;15:127-134.
- 3) Chan YC, Leung PO. Acute pancreatitis. Animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007;34:1-14.
- 4) Osvaldt AB, Viero P, Costa MSTB, Bersch VP, Wendt LR, Rohde L. Pancreatite aguda biliar: um estudo de coorte prospectivo. *Revista HCPA* 2001;21:28-36.
- 5) Fan S, Lai ECS, Mok FPT, Lo C, Zheng S, Wong J. Early treatment of acute biliary pancreatitis by endoscopic papilotomy. *N Eng J Med* 1993 Jan; 328:228-32.

- 6) Neoptolemos JP, London NJ, James D, Carr-Locke DL, Bailey IA, Fossard DP. Controlled trial of urgent endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic sphincterotomy versus conservative treatment for acute pancreatitis due to gallstones. *The Lancet* 1988 Oct;8618:979-983.
- 7) Siech M, Davis MA, Beger HG. Different changes in high-energy phosphates in alcoholic acute pancreatitis and taurocholate acute pancreatitis in rats using NMR spectroscopy at 2.0T. *Pancreas* 1997;15(4):350-357.
- 8) Kaiser AM, Saluja AK, Steer ML. Repetitive short-term obstructions of the common bile-pancreatic duct induce severe acute pancreatitis in the opossum. *Dig Dis Sci* 1999 Aug;44(8):1653-1661.
- 9) Farkas G, Márton J, Nagy Z, et al. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin 6. *Neuroscience letters* 1998;242:147-150.
- 10) Kruse P, Anderson ME, Loft S. Free radical. *Biology & Medicine* 2001;30(3):309-317.
- 11) Orda R., Hadas N, Orda S, Wiznitzer T. experimental acute pancreatitis: inducement by taurocholate sodium-trypsin injection into a temporarily closed duodenal loop in the rat. *Arch Surg* 1980 Mar;115:327-329.
- 12) Satake K, Miura A. A new model for pancreatitis. *Pancreas* 1998;16(3):284-288.
- 13) Granger J, Remick d. Acute pancreatitis: models, markers and mediators. *Shock* 2005;24:45-51.
- 14) Gardner TB, Olenec CA, Chertoff JD, Mackenzie TA, Robertson DJ. Hemoconcentration and pancreatic necrosis. *Pancreas* 2006;33:169-173.

6 DISCUSSÃO GERAL

A insuficiência renal que surge no curso de uma pancreatite aguda é uma complicação reconhecida porém não é estudada com freqüência. O seu desenvolvimento agrava o prognóstico dos pacientes com pancreatite aguda grave (1,2). O tratamento da pancreatite aguda é, até o momento, apenas de suporte. Como já foram relatadas semelhanças entre o choque séptico e a pancreatite aguda, foi realizado o presente estudo para avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato (FBP) sobre as alterações renais secundárias à pancreatite aguda. Já que foi demonstrada a ação benéfica da FBP sobre a sepse (3). No entanto, não há estudos avaliando a FBP em pancreatite aguda.

No presente trabalho, foi demonstrado que a FBP é capaz de prevenir a diminuição da taxa de filtração glomerular secundária à pancreatite aguda, o mesmo não ocorrendo quando era administrada solução salina em volume equivalente. A alteração na taxa de filtração glomerular parece dever-se à necrose tubular aguda, conforme demonstrado pela alteração na fração excretada de sódio. Este valor elevou-se nos ratos submetidos à ligadura do ducto pancreático e esse aumento não ocorreu com a administração de FBP. A administração de solução salina não foi capaz de prevenir essa alteração e, até mesmo, elevou o valor da fração excretada de sódio a um valor superior a 3%. É importante observar que a quantidade de sódio presente na FBP é superior àquela da solução salina.

Além dos parâmetros citados acima, a lesão renal secundária à pancreatite aguda foi também avaliada através da determinação da excreção da N-acetil- β -D-glucosaminidase na urina. Observou-se que o nível desta eleva-se no grupo submetido à ligadura do ducto pancreático, o que sugere lesão tubular proximal. No grupo que recebeu FBP, o valor do NAG foi semelhante ao valor desse grupo. O mesmo não ocorreu com o grupo que recebeu solução salina, onde o valor foi superior aos valores encontrados para esses dois primeiros grupos. Esses resultados sugerem proteção, pelo menos parcial, exercida pela FBP sobre a lesão renal. É possível que o aumento do número de animais em cada grupo auxilie na elucidação deste aspecto. Observa-se que há grande variabilidade no valor do NAG, dado já descrito por Maruhn (4) onde os valores normais encontravam-se entre 1,5 e 29,8 U/L.

O papel desempenhado pelos radicais livres de oxigênio na patogênese da pancreatite aguda já foi sugerido na literatura (5,6). Não foi encontrado, na revisão realizada, estudo algum avaliando o efeito da FBP sobre os radicais livres de oxigênio no curso dessa patologia. No presente estudo, o estresse oxidativo foi avaliado através da determinação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica, aqui determinados dosando-se os produtos resultantes da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi observado um aumento nos níveis de TBARS com a ligadura do ducto pancreático, não evitado pela administração de FBP. No grupo que recebeu solução salina, o nível de TBARS elevou-se significativamente em relação aos demais grupos. Especula-se como mecanismo responsável por esse aumento lesão por isquemia/reperfusão. Nessa situação, a administração de solução salina poderia induzir um aumento da perfusão renal com elevação da produção de radicais livres de oxigênio e conseqüente dano renal, expresso pelo aumento da NAG. A administração de FBP, através de sua ação sobre radicais livres (7), impediria a elevação dos radicais livres e conseqüente dano renal. Isto não foi demonstrado no presente estudo. É possível que níveis sanguíneos não expressem adequadamente eventos teciduais. Será necessária complementação destes dados através da determinação de níveis renais de TBARS.

A análise histológica dos rins de animais dos quatro grupos estudados não mostrou lesão, provavelmente porque o tempo de observação (12 horas pós indução de pancreatite) seja curto para o aparecimento de alterações histológicas.

O desenvolvimento de uma técnica de indução de pancreatite aguda reversível (simulando situação clínica de desobstrução da via biliar) pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na pancreatite aguda e suas complicações. Aplicando-se a técnica desenvolvida neste estudo, os valores da amilase e do hematócrito retornaram aos níveis basais, sugerindo reversibilidade da pancreatite. A técnica pode, futuramente, ser utilizada, por exemplo, em estudos sobre o papel da FBP no tratamento da pancreatite aguda e sobre o efeito da desobstrução do ducto sobre as alterações renais secundárias à pancreatite aguda.

REFERÊNCIAS

- 1) Gutierrez MEH, Perez GS, de Garcia CR, Sanchez MJC, Lopez BN. Características y valor prognóstico del fracaso renal agudo em la pancreatitis aguda grave. *Méd Clin (Barc)* 2000;115:721-725.
- 2) Tran DD, Oe PL, de Fijter CWH, van der Meulen J, Cuesta MA. Acute renal failure in patients with acute pancreatitis: prevalence, risk factors, and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:1079-1084.
- 3) Nunes FB, Graziotin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wachter PH, de Oliveria JR. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003;47:35-41.
- 4) Marunh D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 1976;73:453-461.
- 5) Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 2005;5:492-500.
- 6) Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002;1588:159-164.
- 7) ParkJY, Kim EJ, Kwon KJ, Jung YS, Moon CH, Lee SH, Baik EJ. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res* 2004;1026:295-301.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, conclui-se que:

- a) A frutose-1,6-bisfosfato é capaz de prevenir alterações renais secundárias à pancreatite aguda; mais especificamente:
 - previne a queda da taxa de filtração glomerular secundária à pancreatite aguda;
 - previne o aumento da fração excretada de sódio urinário associada à pancreatite aguda.
- b) A frutose-1,6-bisfosfato não previne o aumento da excreção urinária de NAG associado à pancreatite aguda;
- c) A frutose-1,6-bisfosfato não é capaz de alterar os níveis sanguíneos de radicais livres associados à pancreatite aguda;
- d) A pancreatite aguda pode ser revertida com a liberação do ducto pancreático após 12 horas de obstrução.