

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC

FERNANDA SCHWEITZER SOARES

**PAPEL DA ANTIBIOTICOTERAPIA NA EVOLUÇÃO DA
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

Florianópolis
2013

FERNANDA SCHWEITZER SOARES

**APEL DA ANTIBIOTICOTERAPIA NA EVOLUÇÃO DA
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando
Spiller

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Soares, Fernanda Schweitzer

Papel da antibioticoterapia na evolução da pancreatite
aguda experimental / Fernanda Schweitzer Soares ;
orientador, Fernando Spiller - Florianópolis, SC, 2013.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Pancreatite aguda. 3. Meropenem. 4.
Enterococcus gallinarum. 5. Patobionte. I. Spiller,
Fernando. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“Papel da antibioticoterapia na evolução da pancreatite aguda experimental.”

por

Fernanda Schweitzer Soares

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Portaria 23/PPGFMC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

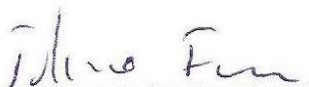
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Fernando Spiller
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Alex Raícho (CFS/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Juliano Ferreira (FMC/CCB/UFSC)

Coordenação do Programa:



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 30 de setembro de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, Cláudio e Roseli, ao meu esposo, Renan, e o ao meu filho José Mateus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar comigo iluminando meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Spiller, por ter me dado oportunidade de realizar este trabalho, por todo auxílio, paciência, orientação e discussão sobre a ciência.

Ao Prof. Dr. André Báfica, pela disponibilidade de realizar o trabalho no Laboratório de Imunobiologia (LiDI) e discussão sobre a ciência, assim como, ao Prof. Dr. Daniel Mansur.

Ao Prof. Artur Smânia por dividir todo seu conhecimento na área de microbiologia, matérias-primas e materiais microbiológicos.

Ao Prof. Marcio Gio do laboratório de microbiologia do Hospital Universitário pela disponibilidade de identificação das amostras bacterianas.

A todos os integrantes e ex-integrantes do LiDI, que dividiram comigo meu segundo lar quando estava em Florianópolis, o laboratório. E por toda a ajuda que me deram.

A todos os laboratórios do MIP, que de uma forma ou de outra tiveram sua contribuição para a realização deste trabalho.

Por último, e de forma alguma menos importante, à minha família, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado. Meu pai Claudio, minha mãe Roseli, Renan meu esposo e agora o José Mateus que esteve comigo realizando meu trabalho do mestrado. Todos possuem uma importância única e especial em minha vida.

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a
Deus, não sou o que era antes”**

Marthin Luther King

RESUMO

A pancreatite aguda (PA) é uma doença pancreática comum, causada principalmente pela obstrução do ducto pancreático por cálculos biliares. A infecção secundária do tecido pancreático necrosado é uma complicação que acomete mais de 50% dos pacientes, sendo que o benefício de antibióticos sistêmicos na prevenção desta infecção é controverso, exigindo estudos adicionais. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito do tratamento com o antibiótico meropenem na PA induzida pela obstrução do ducto biliopancreático em camundongos. Os resultados obtidos demonstraram que a obstrução do ducto biliopancreático em camundongos C57Bl/6 resultou em 100% de mortalidade; aumento nas concentrações séricas de amilase, lipase, fosfatase alcalina e bilirrubina direta; alterações histológicas pancreáticas como edema, infiltrado inflamatório e necrose; bacteremia e presença de bactérias no lavado peritoneal 24 h após a indução da doença, assim como recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal. Tanto o pré- como pós-tratamento com meropenem (100 mg/kg, i.p. 12/12h por 3 dias), acelerou a mortalidade dos camundongos com PA quando comparados aos animais com PA não-tratados. No pré-tratamento, onde a antecipação da mortalidade foi mais evidente, os animais apresentaram bactérias no sangue e lavado peritoneal. Analisando as bactérias encontradas nas amostras sanguíneas, identificamos o *Enterococcus gallinarum*, uma bactéria Gram-positiva multirresistente a antibióticos, que se demonstrou ser patogênica e capaz de ativar o sistema imune. Em conclusão, nossos resultados demonstram que o tratamento com meropenem não foi eficaz na prevenção da infecção e favoreceu a disseminação de um patobionte multirresistente a antibióticos durante a pancreatite aguda experimental.

Palavras-chave: pancreatite aguda, meropenem, *Enterococcus gallinarum*, patobionte.

ABSTRAT

Acute pancreatitis (AP) is a common pancreatic disease, mainly caused by obstruction of the pancreatic duct by gallstones. Secondary infection of pancreatic tissue necrosis is a disorder that affects more than 50% of patients, and the benefit of systemic antibiotics in the prevention of this infection is still controversial, requiring further studies. The aim of this study was to evaluate the effect of treatment with the antibiotic meropenem in experimental AP in mice. The results showed that the obstruction of biliopancreatic duct in C57Bl/6 mice resulted in a 100% of mortality; increased of serum concentrations of amylase, lipase, alkaline phosphatase and direct bilirubin; pancreatic histological changes such as edema, inflammatory infiltrate and necrosis; bacteremia and bacterial in the peritoneal lavage, as well as, recruitment of leukocytes to the peritoneal cavity. When compared to non-treated AP mice, both pre- and post-treated AP mice with meropenem (100 mg/kg, i.p. 12/12h for 3 days), presented faster mortality. In the pre-treatment, where accentuation of mortality was more evident, the animals had bacteria in the blood and peritoneal fluid. Analyzing the bacteria found in the blood samples, we identified it as *Enterococcus gallinarum*, a Gram-positive bacteria multiresistant to antibiotics, which proved to be pathogenic and able to induced immune system activation. In conclusion, our results showed that the meropenem treatment was not effective in preventing infection and induced the spreading of a multidrug-resistant pathobiont during experimental acute pancreatitis.

Keywords: acute pancreatitis, meropenem, *Enterococcus gallinarum*, pathobiont.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Mecanismos diferentes através dos quais a migração de cálculos biliares pode desencadear a pancreatite..... | 16 |
| Figura 2 - Ativação do tripsinogênio em tripsina ativa pela ação da enteroquinase, catepsina B ou autoativação..... | 21 |
| Figura 3 - Dano pancreático libera DAMPs para ativação dos macrófagos pancreáticos e início da resposta inflamatória..... | 23 |
| Figura 4 - Obstrução do ducto biliopancreático..... | 30 |
| Figura 5 - Sobrevida dos camundongos C57BL/6 após indução da pancreatite aguda..... | 38 |
| Figura 6 - Alterações morfológicas no tecido pancreático de camundongos C57BL/6 após indução da pancreatite aguda..... | 40 |
| Figura 7 - Concentrações séricas de amilase, lipase, fosfatase alcalina e bilirrubina direta em camundongos C57BL/6..... | 41 |
| Figura 8 - Camundongos C57BL/6 apresentam bactérias no sangue e lavado peritoneal após indução da pancreatite aguda..... | 42 |
| Figura 9 - Recrutamento de leucócitos para cavidade peritoneal nos camundongos C57BL/6 após indução da pancreatite aguda..... | 43 |
| Figura 10 - Sobrevida dos camundongos C57BL/6 no tratamento com meropenem e indução da pancreatite aguda..... | 48 |
| Figura 11 - Pré-tratamento com meropenem modificou o perfil bacteriano nas amostras de sangue, líquido de ascite e fezes do ceco dos camundongos C57BL/6..... | 49 |
| Figura 12 - <i>Enterococcus gallinarum</i> causa mortalidade em camundongos C57BL/6 quando inoculado vivo na dosagem de 5×10^9 UFC/mL..... | 58 |
| Figura 13 - Ativação de leucócitos Lys-M eGFP pelo <i>Enterococcus gallinarum</i> | 58 |
| Figura 14 - Tratamento com ampicilina reduz mortalidade de camundongos Lys-M eGFP inoculados com <i>Enterococcus gallinarum</i> | 61 |
| Figura 15 - Tratamento com ampicilina reduz mortalidade de camundongos Lys-M e-GFP pré-tratados com meropenem e indução da pancreatite aguda..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Escala de Macfarland..... | 36 |
| Tabela 2 - Alterações morfológicas no tecido pancreático após indução da pancreatite aguda..... | 40 |
| Tabela 3 - Bactérias encontradas nas amostras de sangue coletadas em animais com pancreatite aguda pré-tratados com meropenem..... | 53 |
| Tabela 4 - Antibiograma realizado com amostras bacterianas resistentes ao meropenem..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| ACK | Tampão de Lise ACK |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BHI | Infusão de Cérebro e Coração |
| Ca ²⁺ | Cálcio Divalente |
| CCK | Colecistoquinina |
| CDE | Dieta Deficiente de Colina Suplementada com Etionina |
| Cm | Centímetros |
| CO ₂ | Gás Carbônico |
| CPRE | Colangiopancreatografia Retrógrada Endoscópica |
| DAMPs | Padrões Moleculares Associados ao Dano |
| DNAmt | Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial |
| DNA _n | Ácido Desoxirribonucleico Nuclear |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| ERRO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-1 β | Interleucina-1 beta |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-8 | Interleucina-8 |
| Kg | Quilogramas |
| Mg | Miligramas |
| ml | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| MODS | Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos |
| NAD | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NADH | Hidrato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NAPH-oxidase | Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-oxidase |
| Nm | Nanômetro |
| PA | Pancreatite Aguda |
| PBS | Tampão Fosfato |
| PC | Pancreatite Crônica |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| pró-IL-1 β | Pró-interleucina-1 beta |
| Rpm | Rotações por Minuto |
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SIRS | Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica |

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| SPINK-1 | Serina Protease do Tipo Kasal-1 |
| TA | Temperatura Ambiente |
| TAP | Peptídeo de Ativação do Tripsinogênio |
| TLR9 | Receptor do Tipo Toll-9 |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral – alfa |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UI | Unidades Internacionais |
| μ l | Microlitros |
| μ m | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Epidemiologia e Etiologia..... | 15 |
| 1.2 Modelos Experimentais..... | 17 |
| 1.3 Fisiopatologia da Pancreatite Aguda..... | 19 |
| 1.3.1 Pâncreas..... | 19 |
| 1.3.2 Mecanismos Iniciais da Pancreatite Aguda..... | 19 |
| 1.3.3 Inflamação..... | 22 |
| 1.3.4 Necrose..... | 24 |
| 1.3.5 Translocação Bacteriana..... | 25 |
| 1.3.6 Sintomatologia e Diagnóstico..... | 25 |
| 1.4 Tratamento da Pancreatite Aguda..... | 26 |
| 1.4.1 Antibióticos..... | 27 |
| 2 OBJETIVO | 29 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 Animais..... | 29 |
| 3.2 Local do Desenvolvimento do Estudo..... | 29 |
| 3.3 Modelo Experimental de Pancreatite Aguda..... | 29 |
| 3.4 Dosagens Enzimáticas..... | 30 |
| 3.4.1 Quantificação de Amilase, Lipase, Fosfatase Alcalina e Bilirrubina Direta..... | 30 |
| 3.4.2 Quantificação de Uréia, Creatinina, Lactato Desidrogenase, Aspartato Aminotransferase e Alanina Aminotransferase..... | 30 |
| 3.5 Histologia..... | 31 |
| 3.6 Coleta do Lavado Broncoalveolar | 31 |
| 3.7 Coleta do Lavado Peritoneal | 31 |
| 3.8 Citometria de Fluxo dos Pulmões, Sangue e Lavado Broncoalveolar..... | 31 |
| 3.9 Tratamento com Meropenem..... | 32 |
| 3.10 Tratamento com Ampicilina..... | 32 |
| 3.11 Quantificação de Bactérias..... | 32 |
| 3.12 Identificação Bacteriana..... | 33 |
| 3.12.1 Coloração de Gram..... | 33 |
| 3.12.2 Prova da Catalase..... | 33 |
| 3.12.3 Crescimento em Ágar Sangue | 34 |
| 3.12.4 Crescimento em Caldo NaCl 6,5%..... | 34 |
| 3.12.5 Crescimento em Ágar Bile Esculina..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.12.6 Prova da Optoquina..... | 35 |
| 3.12.7 Identificação da Espécie Bacteriana..... | 35 |
| 3.13 Inoculação Bacteriana..... | 35 |
| 3.14 Antibiograma..... | 37 |
| 3.14.1 Preparação do Inóculo | 37 |
| 3.14.2 Plaqueamento em Ágar Mueller-Hinton..... | 37 |
| 3.14.3 Aplicação dos Discos nas Placas de Ágar Inoculadas..... | 37 |
| 3.14.4 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados..... | 38 |
| 3.14.5 Análise dos Resultados..... | 38 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 4.1 Padronização do Modelo de Pancreatite Aguda pela Obstrução do Ducto Biliopancreático..... | 39 |
| 4.2 Tratamento com Meropenem na Pancreatite Aguda Experimental..... | 47 |
| 4.3 Identificação e Avaliação da Susceptibilidade a Antimicrobianos das Bactérias Encontradas nas Amostras de Sangue dos Animais com Pancreatite Aguda e Pré-tratados com Meropenem..... | 53 |
| 4.4 Avaliação da patogenicidade do <i>Enterococcus gallinarum</i> | 57 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 67 |
| REFERÊNCIAS..... | 68 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Etiologia

A pancreatite aguda (PA) é uma doença pancreática comum, com uma incidência mundial aproximada de 20-80 casos por 100.000 habitantes por ano (FAGENHOLZ et al., 2007; MCKAY et al., 1999; TOH; PHILLIPS; JOHNSON, 2000). No Brasil, segundo dados do DATASUS e IBGE (2006), a incidência é de 15,9 casos por ano para cada 100.000 habitantes (CAMPOS et al., 2008). Além disso, a incidência da PA aumentou nas duas últimas décadas em alguns países da Europa e nos Estados Unidos (JIANG et al., 2012).

Diferenças na incidência da PA podem ocorrer conforme a etiologia da doença e das características da população estudada (GO; EVERHART, 1994). A taxa de homens e mulheres afetados é semelhante, embora a etiologia seja diferente entre os sexos. A PA decorrente da obstrução por cálculos biliares ocorre mais frequentemente em mulheres, enquanto nos homens a principal causa é consumo excessivo de álcool (SWAROOP; CHARI; CLAIN, 2004). As mulheres são mais propensas à formação de cálculos biliares, pelo aumento excessivo dos níveis de estrogênio durante o 2º e 3º trimestres de gestação, no tratamento com pílulas anticoncepcionais ou reposição hormonal. Esse excesso pode aumentar os níveis de colesterol na bile favorecendo a formação de cálculos biliares (WANG et al., 2009; SERPYTIS et al., 2012). A estase biliar que pode advir, também, do período gestacional, favorece a PA (CONSTANTINESCU et al., 2012).

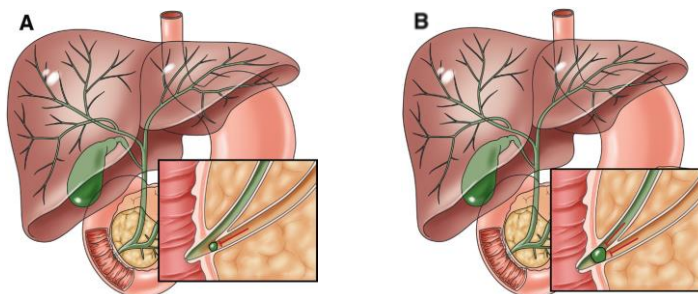
A idade elevada é outro fator que predispõe à PA. Segundo Fagenholz e colaboradores (2007) a taxa de incidência aumenta a partir dos 40 anos, atingindo o seu máximo aos 80 (130 casos/100.000 habitantes). Mudanças na fisiologia do trato biliar e do pâncreas relacionadas à idade como, por exemplo, aumento da litogenicidade da bile e alterações estruturais no pâncreas favorecem o desenvolvimento da PA (ROSS; FORSMATK, 2001).

Além dos fatores mencionados como obstrução por cálculos biliares e consumo excessivo de álcool, a PA pode ocorrer por diversos outros fatores como, causa iatrogênica (como, por exemplo, após colangiopancreatografia retrógrada endoscópica - CPRE), por medicamentos (azatioprina, furosemida, estrógenos), toxinas (escorpião,

organofosforados), disfunção no esfíncter de Oddi, trauma, neoplasia pancreática, alterações metabólicas (hipertrigliceridemia e hipercalcemia), obstrução duodenal, infecção viral ou bacteriana, predisposição genética, dentre outros (BENTREM; JOEHL, 2003; SWAROOP; CHARI; CLAIN, 2004).

Nos países desenvolvidos, a obstrução do ducto biliar comum ao ducto pancreático por cálculos biliares (38%) e consumo excessivo de álcool (36%) são as causas mais frequentes de PA na população adulta (FROSSARD; STEER; PASTOR, 2008; STEINBERG; TENNER, 1994). Em crianças, as causas são muito variáveis, dentre as principais encontram-se as de origem idiopática, por medicamentos, toxinas, traumas, infecções e anormalidades estruturais (MINEN et al., 2012; WERLIN et al., 2003), enquanto que causas genéticas, hiperlipidemia e hipercalcemia são pouco frequentes (BENIFLA; WEIZMAN, 2003).

Uma das principais causas de PA, a obstrução do ducto pancreático, ocorre principalmente por cálculos biliares. Esta obstrução induz a pancreatite pelo aumento da pressão intra-ductal com subsequente ativação prematura das enzimas digestivas dentro do pâncreas (DIEHL et al., 1997; FROSSARD et al., 2000). Essa obstrução pode ocorrer por diferentes maneiras: 1) bloqueio somente do ducto pancreático pelo cálculo biliar (Figura 1A); 2) obstrução de ambos os ductos (biliar e pancreático) (Figura 1B); e 3) a obstrução do ducto biliar comum ao ducto pancreático, gerando refluxo de bile (sais biliares) para o pâncreas; a ação da bile no pâncreas representa um dos eventos desencadeantes da pancreatite (Figura 1C) (LERCH; AGHDASSI, 2010).



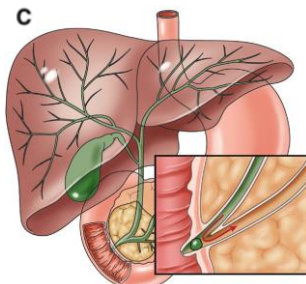


Figura 1. Mecanismos diferentes através dos quais a migração de cálculos biliares pode desencadear a pancreatite. (A) obstrução do ducto pancreático por cálculo biliar; (B) obstrução do ducto biliar comum ao pancreático sem o refluxo de bile para o pâncreas; e (C) obstrução do ducto biliar comum ao pancreático com refluxo da bile para o pâncreas. Adaptado de LERCH e AGHDASSI (2010).

Os cálculos biliares são compostos por cerca de 75% de colesterol (cálculos de colesterol) e 25% de bilirrubinato de cálcio e derivados bilirrubínicos mais complexos (cálculos de pigmento) (GUYTON; HALL, 2006).

1.2 Modelos Experimentais

Existem diversos modelos de PA. Normalmente, os modelos são diferenciados de acordo com a técnica de indução (modelos invasivos e não invasivos) causa (biliar, obstrutiva, alcoólica, tóxica, traumática, isquêmica) ou grau de gravidade (edematosa leve, edematosa grave e necrosante) (FOITZIK et al., 2000).

Dentre os modelos mais empregados para avaliação da fisiopatologia da PA estão: dieta deficiente de colina e suplementada com etionina (CDE) (LOMBARDI et al., 1975; LOMBARDI, 1976; NIEDERAU et al., 1992), infusão de ceruleína (NIEDERAU; FERRELL; GRENDALL, 1985); administração de L-arginina (KISHINO et al., 1984; TANI et al., 1990), perfusão retrógrada do ducto biliopancreático (LIGHTNER; KIRKWOOD, 2001) e obstrução do ducto biliopancreático (MANSO; RAMUDO; DE DIOS, 2007).

No modelo de CDE os animais desenvolvem pancreatite hemorrágica grave com uma mortalidade de 80-100%, após 2-8 dias. No

entanto, a PA não é a única causa de morte. Os animais também apresentam alterações no fígado e sistema nervoso central que contribuem para a falência múltipla dos órgãos (independente da PA) (LOMBARDI; ESTES; LONGNECKER, 1975).

A infusão de baixas doses de ceruleína, um análogo de colecistoquinina (CCK), gera uma estimulação supramáxima do pâncreas aumentando a produção das secreções pancreáticas nas células exócrinas, gerando uma PA edematosa, com infiltração de células inflamatórias, sem necrose celular. Além disso, a gravidade e o curso da doença nesse modelo são muito variáveis em camundongos (VAN MINNEN et al., 2007).

Administração de L-arginina é feita por via intraperitoneal e a gravidade está relacionada com a dose administrada (TANI et al., 1990). A lesão inicia com desorganização do retículo endoplasmático e degradação de grânulos de zimogênio e 24 e 48hs após necrose das células acinares (KISHINO et al., 1984). Doses elevadas de L-arginina, como 500mg/100g de peso corporal (i.p.) e mais 3 administrações de 250mg/100g por 10 dias (DELANEY et al., 1993) e 350mg/100 g de peso corporal (i.p.) por 1-4 semanas (WEAVER et al., 1994) podem ser utilizadas para a indução de pancreatite crônica.

Indução da PA por perfusão do ducto biliopancreático envolve a infusão de sais biliares ou enzimas pancreáticas ativadas no ducto biliopancreático. Estas soluções mais comumente utilizadas contêm várias concentrações de sais biliares com diferenças na hidrofobicidade, ocasionando edema pancreático, destruição do parênquima pancreático e formação de necrose (LIGHTNER; KIRKWOOD, 2001).

No modelo de obstrução do ducto biliopancreático ocorre o refluxo das secreções biliares e pancreáticas, ocasionando um processo autolítico de autodigestão pancreática (LUNDBERG et al., 2000). Neste modelo a obstrução do fluxo da bile pode provocar um supercrescimento bacteriano no intestino, translocação bacteriana (NIEUWENHUIJS et al., 2000) e a exclusão de proteases pancreáticas no lúmen do intestino delgado alterando a permeabilidade intestinal (DEITCH et al., 2003).

A PA induzida por ligação do ducto biliopancreático é uma analogia experimental útil para investigação da patogênese da pancreatite causada pela obstrução de cálculo biliar (SAKAGUCHI et

al., 2006; SAMUEL et al., 1995; SCOGGINS et al., 2000; MANSO; RAMUDO; DE DIOS, 2007; MOOREN et al., 2003; YAMASAKI et al., 2006).

1.3 Fisiopatologia da Pancreatite Aguda

1.3.1 Pâncreas

O pâncreas é uma glândula com funções tanto endócrina quanto exócrina (GUYTON; HALL, 2006).

O pâncreas endócrino é composto de células denominadas ilhotas de Langerhans, compostas por quatro tipos celulares classificadas de acordo com sua secreção: células beta que produzem insulina e amilina; células alfa produtoras de glucagon; células delta que produzem somatostatina; e células PP produtoras de polipeptídeo pancreático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A secreção pancreática exócrina contém diversas enzimas produzidas pelos ácinos pancreáticos, as quais auxiliam no processo de digestão dos alimentos (GUYTON; HALL, 2006). Entre as principais enzimas produzidas pelo pâncreas estão o tripsinogênio, quimiotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase, calicreinogênio, amilase, profosfolipase, prolipase, fosfolipase A2 e ribonuclease, desoxirribonuclease (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As proteases das células acinares são sintetizadas na forma inativa como pró-enzimas e armazenadas em grânulos citoplasmáticos de zimogênio. Estas pró-enzimas são liberadas a partir da membrana apical dos ácinos para o lúmen ductal e transportadas para o duodeno, onde o tripsinogênio é ativado em tripsina pela enzima enteroquinase presente na membrana intestinal (MAYER et al., 1999). A tripsina ativada converte as outras pró-enzimas em enzimas ativas, auxiliando no processo de digestão.

1.3.2 Mecanismos Iniciais da Pancreatite Aguda

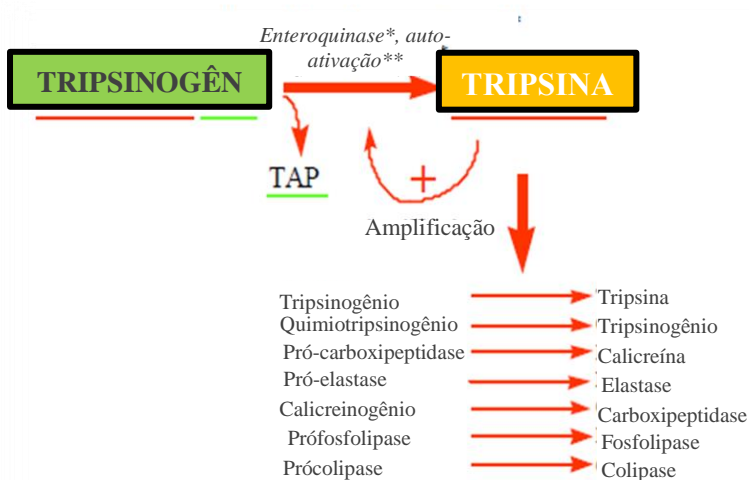
A PA inicia quando mecanismos intracelulares de proteção que evitam a ativação do tripsinogênio ou reduzem a atividade da tripsina estão sobrecarregados. Estes mecanismos de proteção incluem a síntese de tripsina inativa como tripsinogênio, autólise da tripsina

ativada, compartimentalização das enzimas digestivas, síntese de inibidores específicos da tripsina ($\alpha 1$ -antitripsina, $\alpha 2$ -antitripsina e inibidor de serina protease do tipo Kazal 1 (SPINK-1) e baixas concentrações intracelulares de Ca^{2+} (FROSSARD et al., 2008; RINDERKNECHT et al., 1986).

Existem duas principais teorias em relação aos mecanismos moleculares iniciais que precedem a lesão das células pancreáticas. A primeira consiste na teoria da co-localização (HOFBAUER et al., 1998; OTANI et al., 1998) e a segunda na auto ativação prematura do tripsinogênio (WHITCOMB, 1999a; WHITCOMB, 1999b). Estas duas teorias atribuem a ativação do tripsinogênio como o desencadeador da cascata de ativação enzimática que leva a degradação do pâncreas (MAYER et al., 1999; SHA; MA; JHA SHA, 2009).

A teoria da co-localização afirma que a ativação das enzimas digestivas dentro das células acinares inicia quando ocorre a fusão dos grânulos de zimogênio inativos com as vesículas lisossomais, as quais contem catepsina B. Esta hidrolase age quebrando o tripsinogênio em peptídeo de ativação do tripsinogênio (TAP) e tripsina ativa (FIGARELLA et al., 1988; GREENBAUM; HIRSCHKOWITZ, 1961; HOFBAUER et al., 1998; KRIMS; PANDOL, 1988; MAYER et al., 1999; SALUJA et al., 1997; WHITCOMB et al., 1996). A tripsina ativa intracelularmente pode promover a digestão celular e ativação das outras pró-enzimas como o tripsinogênio, quimiotripsinogênio, proelastase, calicreinogênio, procarboxipeptidase, profosfolipase e prolipase (NORMAN, 1998).

A segunda teoria postula que a ativação do tripsinogênio ocorre sob condições de pH baixo e torna-se patológico apenas com o bloqueio da secreção. Comumente, uma fração do tripsinogênio humano auto ativa-se para tripsina ativa, a qual pode catalisar uma cascata de ativação do tripsinogênio bem como ativar todas as outras pró-enzimas levando a autodigestão da glândula (figura 2). Este processo é regulado por duas linhas de defesa (WITT et al., 2000).



*Via Normal: enteroquinase está localizada na borda em escova do intestino delgado

**Via Normal:auto-ativação do tripsinogênio é uma característica única do tripsinogênio humano

***Via Anormal: catepsina B está localizada dentro das células

Figura 2: Ativação do tripsinogênio em tripsina ativa pela ação da enteroquinase, catepsina B ou autoativação. A autoativação é uma característica do tripsinogênio humano. Adaptado de FROSSARD, 2001.

A primeira linha de defesa está relacionada ao SPINK-1. Quando a atividade da tripsina está reduzida o SPINK-1 consegue inibir e impede a sua auto atividade e conseqüente ativação das demais pró-enzimas digestivas. No entanto, durante a ativação excessiva do tripsinogênio, a capacidade inibitória do SPINK-1 está sobrecarregada e o aumento da atividade da tripsina permanece (WHITCOMB, 1999b; FROSSARD, 2001).

A segunda linha de defesa é realizada pela própria tripsina com objetivo de evitar sua ativação descontrolada. Esta protease, através de um mecanismo de retroalimentação negativa, hidrolisa seu local de reconhecimento (denominado R122H). Isto resulta na inativação permanente da enzima prevenindo a ativação subsequente de outras pró-enzimas (WHITCOMB, 1999b).

A co-localização intra-acinar das enzimas digestivas e lisossomais é uma característica importante no dano pancreático experimental, mas a relevância desta co-localização na patologia da PA humana permanece obscura. Outra característica observada na PA experimental é o rompimento da barreira paracelular das células acinares e dos ductos intralobulares pancreáticos com extravasamento das enzimas pancreáticas para o interstício, podendo ocasionar a ativação das pró-enzimas em enzimas ativas e conseqüentemente lesão e necrose celular (FROSSARD, 2001).

1.3.3 Inflamação

A destruição da membrana dos ácinos pancreáticos libera conteúdos intracelulares para o espaço extracelular e algumas moléculas, como DNA mitocondrial (DNAm_t), DNA nuclear (DNAn) e ATP, induzindo uma resposta inflamatória local. Essas moléculas são denominadas de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) (KONO; ROCK, 2008; NORMAN, 1998) e estão envolvidos em uma série de respostas inflamatórias estéreis (KUBES; MEHAL, 2012).

O DNAm_t e DNAn liberados pela lesão das células acinares ligam-se ao receptor do tipo Toll-9 (TLR-9) e o ATP ao receptor purinérgico P2X7, presentes em células adjacentes íntegras como macrófagos (figura 3). A ativação destes receptores de DAMPs resulta no aumento de pró-citocinas, como a pró-interleucina-1 β (pró-IL-1 β), e ativação de caspase-1, uma protease celular necessária para a clivagem da pró-IL1 β em IL-1 β ativa. A caspase-1 é um componente central do complexo citosólico denominado inflamassoma que está relacionado com respostas inflamatórias induzidas por DAMPs ou componentes de patógenos como bactérias e vírus (BECKER; O'NEILL, 2007).

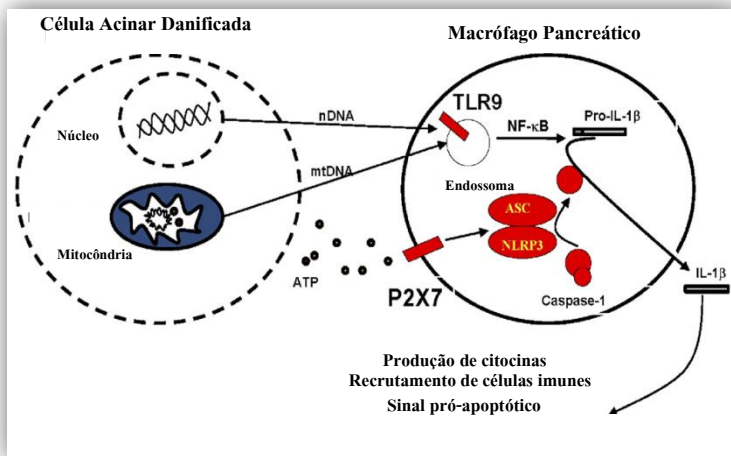


Figura 3: Dano pancreático libera DAMPs para ativação dos macrófagos pancreáticos e início da resposta inflamatória. Adaptado de HOQUE et al. (2011).

A inflamação iniciada é amplificada com a produção local de mediadores, como IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) a partir de macrófagos presentes no tecido pancreático (NORMAN et al., 1996).

Essa produção local de citocinas e quimiocinas induz o recrutamento de neutrófilos com infiltração nas regiões perivasculares do pâncreas (DUGERNIER et al., 2003; SATOH et al., 1999; MAYER et al., 2000). A lesão endotelial nos capilares pancreáticos mediada pelos neutrófilos iniciada por espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela NAPH-oxidase (NORMAN, 1998).

A lesão das células endoteliais aumenta a permeabilidade microvascular permitindo a passagem de neutrófilos e macrófagos para o pâncreas, bem como produtos do complemento e citocinas, os quais contribuem para a lesão das células acinares e amplificação da resposta inflamatória (DUGERNIER et al., 2003; MAYER et al., 2000; NORMAN, 1998; SATOH et al., 1999).

Adicionalmente às complicações locais, uma resposta sistêmica pode ocorrer a partir de neutrófilos ativados e produtos do sistema complemento incidindo posteriormente na Síndrome da

Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS). Esta resposta não pode ser atribuída somente ao extravasamento de enzimas digestivas ativas e mediadores inflamatórios para a cavidade abdominal. Lesões no endotélio dos capilares ocorrem em órgãos distantes, sendo os pulmões são os primeiros a serem acometidos. Extravasamento capilar sistêmico pode ocorrer secundariamente à liberação de mediadores, tais como histamina e bradicinina (BENTREM et al., 2003).

Portanto, independentemente do fator inicial que desencadeia a doença, a gravidade da PA está relacionada com a lesão das células acinares e a ativação de células inflamatórias e endoteliais, conseqüentemente com complicações locais, como necrose, formação de pseudocisto e abscesso, podendo ocasionar lesões em órgãos distantes (PASTOR; MATTHAY; FROSSARD, 2003).

1.3.4 Necrose

A maioria dos pacientes que desenvolvem PA leve a moderada apresentam alterações histológicas reversíveis no tecido pancreático, tais como edema leve do parênquima, infiltração interlobular de células inflamatórias, os ácinos pancreáticos apresentam-se estruturalmente íntegros e o fluxo de sangue é mantido nos pequenos capilares e vênulas (TOYAMA et al., 1996).

Entretanto, pacientes que desenvolvem PA grave, também denominada de PA necrosante, apresentam destruição hemorrágica grave do pâncreas posteriormente tornando-se necrótico. As áreas de necrose podem ser encontradas ao lado de lóbulos saudáveis, juntamente com intensa reação inflamatória e infiltrado celular. Características histológicas da doença avançada incluem extensa necrose da célula acinar, formação de microabscessos intersticiais, necrose gordurosa peripancreática, trombose microvascular e hemorragia local (FIERS et al., 1999).

A necrose pancreática é a complicação local mais grave na PA. Inicialmente é estéril, porém pode tornar-se infectada. A infecção desenvolve-se durante a segunda e terceira semanas em 40-70% dos pacientes aumentando sua mortalidade (FROSSARD et al., 2008), sendo ocasionada por bactérias de origem intestinal através da translocação bacteriana (BALTHAZAR et al., 1990).

1.3.5 Translocação Bacteriana

A translocação bacteriana é definida como a migração de bactérias viáveis ou endotoxinas através da mucosa epitelial para sítios extra-intestinais estéreis (VAN LEEUWEN et al., 1994).

Modificações na microbiota e motilidade intestinal, na função de barreira da mucosa, e na resposta imune levam à translocação bacteriana com consequente infecção da necrose pancreática (VAN MINNEN et al., 2007; CICALESE et al., 2001).

A motilidade intestinal pode afetar a microbiota intestinal. Em modelos animais de PA induzida por obstrução do ducto biliopancreático ocorre diminuição da motilidade intestinal através da inibição dos complexos mioelétricos migratórios (LI et al., 1993). Sem estas contrações no lúmen que se propagam a partir do estômago ou do duodeno ao íleo terminal, a microbiota intestinal permanece no local resultando no crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado (LEE; PIMENTEL, 2006; LIN, 2004). Neste contexto, a translocação bacteriana torna-se consequência da motilidade intestinal deficiente (MOODY et al., 1995), sendo que a ocorrência de crescimento bacteriano excessivo no intestino delgado foi correlacionada positivamente com a gravidade da pancreatite (VAN FELIUS et al., 2003).

A infecção secundária da necrose pancreática é uma complicação que acomete mais de 50% dos pacientes, ocorrendo com mais frequência entre 2 a 3 semanas do início da doença (BASSI et al., 2003; GOLUB; SIDDIQI; POHL, 1998; SAINIO et al., 1995) e que aumenta a taxa de mortalidade para 80% (BARON; MORGAN, 1999; BEGER et al., 1986; BRADLEY, 1989; BRITISH SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY, 1998; SCHMID et al., 1999; WIDDISON; KARANJIA, 1993).

Quando se suspeita de infecção no tecido pancreático é realizado aspiração para bacteriologia e inicia-se o tratamento profilático com antibióticos. Esse tratamento é rapidamente interrompido se a infecção não for confirmada (HEINRICH et al., 2006).

1.3.6 Sintomatologia e Diagnóstico

O sintoma inicial em pacientes com pancreatite aguda é a presença de dor aguda e constante na área epigástrica ou no quadrante superior direito abdominal (BRADLEY, 1993; FAZAR; GOLDBERG, 2006; KEMPPAINEN et al., 1998). A dor pode durar por vários dias, irradiar para as costas, e ser associada a náuseas e vômitos. A amilase e lipase são enzimas liberadas a partir de células acinares durante a PA, e suas concentrações no soro são utilizadas para confirmar o diagnóstico (FERREIRA et al., 2008; MATULL; PEREIRA; O'DONOHUE, 2006).

Concentrações séricas de amilase superiores a três vezes o limite normal corroboram com o diagnóstico de pancreatite aguda (SMOTKIN; TENNER, 2002). A concentração de amilase geralmente sobe no soro dentro de algumas horas após o início dos sintomas e retorna aos valores normais dentro de 3-5 dias. No entanto, a atividade da amilase pode permanecer dentro dos limites normais na admissão de 19% dos pacientes (CLAVIEN et al., 1989; WINSLET; HALL; LONDON, 1992).

Além disso, a concentração sérica de amilase pode estar elevada na ausência de PA como, por exemplo, na macroamilasemia, em pacientes com filtração glomerular diminuída, em doenças das glândulas salivares e em doenças abdominais extrapancreáticas associadas com inflamação, incluindo apendicite aguda, colecistite, obstrução intestinal e úlcera péptica (SWENSSON; MAULL, 1981).

A concentração sérica da lipase permanece elevada durante um período de tempo maior do que a de amilase, apresentando-se como uma vantagem em relação à dosagem da amilase em pacientes com uma apresentação tardia. A lipase também pode apresentar-se elevada no soro em outras patologias intra-abdominais ou insuficiência renal (STERNBY et al., 1996).

1.4 Tratamento da Pancreatite Aguda

Nas formas leves da doença, além do tratamento etiológico, a terapia utilizada é de suporte e inclui reposição volêmica, administração de oxigênio, analgésicos e antieméticos, sendo que a alimentação oral é interrompida. Por outro lado, as formas mais graves (20% dos pacientes) precisam de acompanhamento de uma equipe multidisciplinar, incluindo gastroenterologistas, radiologistas

intervencionistas, intensivistas e cirurgiões (UHL et al., 2002; UK GUIDELINES, 2005).

No entanto, apesar dos esforços para iniciar um tratamento adequado, a taxa de mortalidade na PA grave não mudou substancialmente durante as últimas duas décadas (UHL et al., 2002).

1.4.1 Antibióticos

As infecções na pancreatite são muitas vezes polimicrobianas e envolvem tanto bactérias aeróbias e anaeróbias. As espécies bacterianas predominantes encontradas no tecido pancreático ou a partir de culturas de sangue incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., e *Enterococos* spp. (BASSI et al., 2003; BEGER et al., 1986; BRADLEY, 1987; JOHNSON; STEPHENS; SARR, 1991; MARAVI-POMA et al., 2003; RATTNER et al., 1992; SARR et al., 1991; STANTEN; FREY, 1990).

A profilaxia com antibióticos de amplo espectro tem sido proposta para todos os pacientes com PA grave com objetivo de reduzir a incidência de infecção pancreática e peripancreática, assim como a mortalidade (MAYERLE et al., 2004).

Espectro de ação adequado em conjunto com a concentração efetiva no tecido pancreático representam propriedades essenciais de um antibiótico a ser utilizado na profilaxia da infecção pancreática (BASSI, 1994; BUCHLER et al., 1992). Antibióticos como clindamicina, imipenem, meropenem, metronidazol, fluoroquinolonas, cefalosporinas possuem uma boa penetração no pâncreas, enquanto os aminoglicosídeos não apresentam (BASSI et al., 2003; GOLUB et al., 1998; RUNZI et al., 2005; SAINIO et al., 1995).

O imipenem é um antibiótico da classe dos carbapenêmicos com maior atividade nos microrganismos presentes nas infecções pancreáticas quando comparado às outras classes de antibióticos (BASSI et al., 1994; BUCHLER et al., 1992). Deste modo, o imipenem é atualmente considerado o antibiótico de primeira escolha para a prevenção de complicações sépticas na PA.

O meropenem também pertence a classe dos carbapenêmicos e apresenta vantagens em relação ao imipenem: características estruturais que conferem maior estabilidade à

deidropeptidase renal-I, enzima que degrada o imipenem, eficácia maior contra microrganismos gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto, o meropenem representa uma alternativa válida e segura ao imipenem (BONFIGLIO; RUSSO; NICOLETTI, 2002; DRUSANO, 1997).

No entanto, o emprego de antibióticos sistêmicos no tratamento da pancreatite é controverso, pois seu benefício é questionado por diversos estudos. Alguns mostram que a profilaxia com antibióticos reduziu a mortalidade e morbidade de pacientes com necrose pancreática infectada (BASSI et al., 2003; BUCHLER et al., 1992; HEINRICH et al., 2006; NORDBACK et al., 2001; PEDERZOLI et al., 1993; SAINIO et al., 1995) enquanto outros não revelaram qualquer vantagem (ISENMANN et al., 2004; NORDBACK et al., 2001; PEDERZOLI et al., 1993; SAINIO et al., 1995; SCHWARZ et al., 1997).

Portanto, existe uma necessidade de estudos adicionais sobre a eficácia dos antibióticos na prevenção da infecção na PA grave (BANKS, 1997; BRITISH SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY, 1998; ISENMANN et al., 2004; LAYER et al., 2001). Nossa hipótese, que será avaliada nesse estudo, é que o tratamento com meropenem diminua a carga bacteriana do camundongo evitando a infecção pancreática decorrente da PA e levando a um aumento na taxa de sobrevida.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do tratamento com meropenem na PA induzida pela obstrução do ducto biliopancreático em modelo murino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos machos e fêmeas, da linhagem C57BL/6 selvagem e LysM-eGFP (C57BL/6), com idade entre 6 a 8 semanas, foram utilizados para os experimentos. Os animais foram alimentados em regime *ad libitum* e mantidos em ciclo claro/escuro de 12h a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, foram fornecidos pelo Infectório Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia MIP/CCB/UFSC. Todos os experimentos que utilizaram animais neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA - UFSC), sob protocolo PP00662.

3.2 Local do Desenvolvimento do Estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia-LIDI, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia-MIP, do Centro de Ciências Biológicas-CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC.

3.3 Modelo Experimental de Pancreatite Aguda

A PA foi induzida pelo modelo de obstrução do ducto biliopancreático (CHURG; RICHTER, 1971). Os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg, intraperitoneal) e xilazina (15 mg/kg, intraperitoneal), e uma incisão mediana de aproximadamente 1cm foi realizada na cavidade abdominal. Subseqüentemente realizou-se a exposição do ducto biliopancreático adjacente ao intestino delgado, dissecando-o e um fio de algodão estéril com auxílio de uma canula P10 de aproximadamente 3 mm foram utilizadas para obstrução do ducto, conforme ilustrado na figura 4 abaixo. Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo,

contudo, obstrução do ducto biliopancreático (animais falso-operados). Após, o intestino delgado foi recolocado no interior do abdômen e suturado. Os animais receberam 1ml de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril (subcutâneo) imediatamente após a cirurgia para reposição fluídica. No experimento de sobrevida os animais foram acompanhados por 10 dias após a cirurgia.

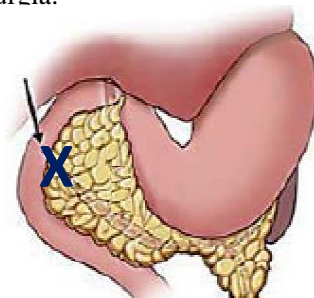


Figura 4: Obstrução do ducto biliopancreático.

3.4 Dosagens Enzimáticas

As dosagens enzimáticas foram realizadas no sangue dos animais anestesiados, sendo obtido por punção cardíaca.

3.4.1 Medida da Atividade Enzimática de Amilase, Lipase, Fosfatase Alcalina e Bilirrubina Direta

As medidas das atividades enzimáticas de amilase, lipase, fosfatase alcalina, bilirrubina direta foram avaliadas 1, 4 e 24h após a indução da PA utilizando kit comercial da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa/MG, Brasil), exceto a lipase que foi utilizado kit comercial da In Vitro Diagnóstica Ltda (Itabira/MG, Brasil). Todas as medições foram realizadas conforme as indicações do fabricante.

3.4.2 Medida da Atividade Enzimática de Uréia, Creatinina, Lactato Desidrogenase, Aspartato Aminotransferase e Alanina Aminotransferase

As medidas das atividades enzimáticas de uréia, creatinina, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram avaliadas três e cinco dias após o tratamento com meropenem nas dosagens de 30mg/kg e 100mg/kg, utilizando kit comercial da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa/MG, Brasil), sendo realizadas conforme as indicações do fabricante.

3.5 Histologia

As amostras de pâncreas foram fixadas em formalina tamponada a 10% com subsequente desidratação através de diferentes concentrações de etanol, impregnadas com parafina, cortadas em blocos (espessura aproximada de 4µm) e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Foram observados 5 campos aleatórios no microscópio para cada amostra de tecido atribuindo-se uma classificação da lesão histológica que variou de leve (†) a intenso (†††). Nesta escala de lesão os parâmetros avaliados foram edema, necrose e infiltrado inflamatório. Foi realizado um corte histológico para cada amostra.

3.6 Coleta do Lavado Broncoalveolar

Para coleta do lavado broncoalveolar (LBA) foi utilizada uma solução de PBS+EDTA 1mM, com auxílio de um cateter calibre 18G inserido na traquéia. Injetou-se 1ml dessa solução lavando por 3 vezes.

3.7 Coleta do Lavado Peritoneal

Para coleta do lavado peritoneal (LP) injetou-se 1,5ml de solução estéril de PBS+EDTA 1mM na cavidade peritoneal. Delicadamente movimentou-se o abdômen do animal de modo que o PBS se misturasse homogeneamente com o líquido peritoneal. Após este procedimento realizou-se a coleta.

3.8 Citometria de Fluxo dos Pulmões, Sangue e Lavado Broncoalveolar

Camundongos LysM-eGFP foram utilizados para obtenção dos leucócitos pulmonares, sanguíneos e do lavado broncoalveolar.

Os pulmões perfundidos foram colocados em contato com a colagenase (0,7mg/ml), quarenta minutos após os mesmos foram macerados e os leucócitos separados por centrifugação com solução de Percoll isotônico. Os leucócitos sanguíneos foram obtidos do sangue dos animais, retirado por punção cardíaca, e lisou-se as hemácias. Os leucócitos do LBA foram obtidos a partir da coleta do lavado descrito no item 3.6. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSVerser.

3.9 Tratamento com Meropenem

No pré-tratamento os animais receberam Meropenem na dose de 100mg/kg pela via intraperitoneal, de 12-12 horas, por três dias. Após 12 horas da última administração do antibiótico foi realizada a indução da PA.

No pós-tratamento os camundongos receberam Meropenem 100mg/kg (i.p.), de 12-12 horas, por três dias 12 horas após a obstrução do ducto biliopancreático.

3.10 Tratamento com Ampicilina

Doze horas após a indução da PA os animais foram tratados com Ampicilina. Foi utilizado uma dose de ataque inicial de 100mg/kg por via subcutânea, 12 horas após iniciou-se o tratamento com ampicilina na dose de 50mg/kg, sendo administrado a cada 12 horas, por três dias.

3.11 Quantificação de Bactérias

Após 1, 4 e 24 horas a indução da PA realizou-se a contagem de bactérias no sangue e LP, coletados assepticamente. Alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram plaqueadas em ágar Mueller–Hinton e as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas após incubação de 24hs a 37°C.

Nos grupos dos animais pré-tratados com meropenem e indução da PA foram realizados coleta de sangue, líquido de ascite (LP)

e fezes do ceco para quantificação bacteriana. A coleta destes materiais biológicos foi realizada 24 horas após a indução da PA.

Alíquotas de 10 µL de sangue e líquido de ascite foram plaqueadas diretamente em ágar Mueller-Hinton e ágar Sangue, incubação por 24hs, a 37°C, em condições de aerobiose e anaerobiose. As UFCs foram contadas após 24 horas de crescimento e os resultados expressos em UFC/ml.

As amostras das fezes do ceco foram diluídas antes de serem plaqueadas: 0,01g de fezes foram diluídas em 1000 µl de salina estéril, desta realizou-se diluição de 10² em salina estéril. Desta diluição 10 µl foram semeados em ágar Mueller-Hinton e ágar Sangue com incubação por 24hs, a 37°C e em condições de aerobiose e anaerobiose. As UFCs foram contadas e os resultados expressos em UFC/g de fezes.

3.12 Identificação Bacteriana

Foram identificadas as bactérias encontradas no sangue dos animais pré-tratados com meropenem e que foi realizada a indução da PA.

3.12.1 Coloração de Gram

O método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram, em 1884, e que consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica. Essa técnica permite a separação de amostras bacterianas em Gram-positivas e Gram-negativas (MURRAY et al., 2007).

3.12.2 Prova da Catalase

Esta enzima atua sobre o peróxido de hidrogênio a 3% desdobrando-o em oxigênio e água. Com a alça bacteriológica ou com um palito estéril coletou-se o centro de uma colônia isolada e esfregou em uma lâmina de vidro, colocou sobre este esfregaço uma gota de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) a 3%. A prova é considerada positiva quando há formação de bolhas devido a liberação do oxigênio (KONEMAN, 2001).

A catalase é produzida por muitos microrganismos e é usualmente empregada para diferenciar a família *Micrococaceae* (estafilococos) onde a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família *Streptococcaceae* (estreptococos) é negativa (TORTORA et al., 2012).

3.12.3 Crescimento em Ágar Sangue

O crescimento em ágar Sangue foi utilizado para verificação da morfologia das colônias e atividade hemolítica (alfa e beta) de alguns microrganismos, onde se pode diferenciar *Streptococcus* e *Staphylococcus*. As colônias de estafilococos são geralmente maiores, convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo podendo apresentar hemólise ou não. As colônias de estreptococos tendem a ser menores (puntiformes), e com halos de hemólise total ou parcial (beta e alfa hemólise) (MURRAY et al., 2007).

O ágar Sangue é um meio não seletivo que permite o crescimento da maioria dos microrganismos de difícil crescimento, como: Gram-positivos e Gram-negativos (TORTORA et al., 2012). Foi utilizado meio base para ágar Sangue (HIMEDIA) o qual foi enriquecido com 5% de sangue de carneiro. A inoculação foi realizada pela técnica de esgotamento para o isolamento do microrganismo.

A interpretação do resultado foi realizada conforme KONEMAN (2001): a) Alfa-hemólise é a presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (hemólise parcial dos eritrócitos); b) Beta-hemólise é a presença de halo transparente ao redor das colônias semeadas (hemólise total dos eritrócitos); e c) Gama-hemólise consiste na ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros).

3.12.4 Crescimento em Caldo NaCl 6,5%

Este caldo foi utilizado para verificar a capacidade da bactéria de crescer em meio com 6,5% de NaCl. O resultado é considerado positivo quando ocorre crescimento bacteriológico verificando-se com a presença da turvação do meio. No resultado negativo não há crescimento e o meio permanece límpido com a cor original (KONEMAN, 2001).

Somente os enterococos possuem a capacidade de crescer nesta concentração elevada de sal (TORTORA et al., 2012).

3.12.5 Crescimento em Ágar Bile Esculina

Meio inclinado utilizado para verificar a capacidade de algumas bactérias hidrolizar a esculina na presença da bile resultando na formação de glicose e esculina. A inoculação foi realizada por estrias na superfície inclinada do meio, a 37°C, por 24 horas. Após este período o resultado é considerado positivo quando ocorre enegrecimento do meio após inoculação. No resultado negativo o meio permanece inalterado (KONEMAN, 2001).

Todos os estreptococos do grupo D de Lancefield apresentam a bile esculina positiva, seja *Enterococcus* spp. ou *Streptococcus* do grupo D não enterococo (*Streptococcus bovis*) (MURRAY et al., 2007).

3.12.6 Prova da Optoquina

Nesta prova semeou metade de uma placa de ágar Sangue com a bactéria teste e aplicou um disco de optoquina (5 µg), incubou a 37°C, por 24 horas. Após este período foi verificada a ocorrência de um halo inibitório de crescimento ao redor do disco, se esta zona medir 14 mm ou mais significa que o microrganismo é sensível (KONEMAN, 2001).

3.12.7 Identificação da Espécie Bacteriana

Para identificação da espécie as bactérias foram crescidas em caldo BHI, a 37°C, por 4-5 horas. Após este período realizou-se a inoculação de uma alíquota de 10 µl em meio ágar Sangue, por esgotamento e incubado por 24 horas, a 37°C. A partir destas placas foi realizada a coloração de gram. Uma suspensão bacteriana das colônias isoladas foram inoculadas no Cartão de Identificação de Gram-positivos ou Gram-negativos (Vitek[®] 2, bioMérieux, França).

3.13 Inoculação Bacteriana

O *Enterococcus gallinarum* identificado foi inoculado, tanto vivo quanto morto, pela via endovenosa em diferentes concentrações $1,6 \times 10^8$ UFC/animal, $6,4 \times 10^8$ UFC/animal e 5×10^9 UFC/animal.

Alíquotas do *E. gallinarum* foram feitas crescendo esta bactéria em caldo BHI até a fase log de crescimento desta bactéria. Esta fase foi verificada espectrofotometricamente a 600nm obtendo-se a leitura absorbância de 0,6, quando comparado ao caldo sem crescimento bacteriano. A partir deste crescimento foram realizadas alíquotas de 400 μ l + 400 μ l de solução de glicerol 50%, armazenando-as em -80°C .

Para a inoculação do *E. gallinarum* nos camundongos alíquotas foram crescidas em 35 ml de caldo BHI, a 37°C , sob agitação constante (150 rpm) até a obtenção da leitura 0,6 no espectrofotômetro. Após este processo centrifugou-se a 3000 rpm, por 15 minutos, a 20°C . Descartou-se o sobrenadante. Lavou-se as bactérias obtidas duas vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Ressuspendeu o pellet final com 1 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Para a quantificação das bactérias realizou-se uma diluição seriada do pellet de bactérias obtido. Foram realizadas as leituras a 600 nm. A partir dos resultados comparou-se a Escala de MacFarland, conforme tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Escala de MacFarland.

| Escala | Absorbância* | Quantidade de bactéria correspondente (10^9/ml) |
|---------------|---------------------|---|
| 0,5 | 0,148 | 0,15 |
| 1 | 0,286 | 0,3 |
| 2 | 0,447 | 0,6 |
| 3 | 0,797 | 0,9 |
| 4 | 1,091 | 1,2 |
| 5 | 1,343 | 1,5 |
| 6 | 1,604 | 1,8 |
| 7 | 1,828 | 2,1 |
| 8 | 1,973 | 2,4 |
| 9 | 2,109 | 2,7 |
| 10 | 2,314 | 3 |

*Absorbância a 600 nm (MURRAY et al., 2007).

Para confirmação da quantidade de bactérias foram realizadas diluições seriadas variando de 10^{-1} a 10^{-8} . Alíquotas de 10 μ l das diluições 10^{-6} a 10^{-8} foram plaqueadas, em triplicata, em ágar Mueller-Hinton, incubadas a 37°C. Vinte e quatro horas após as UFC foram contadas verificando-se a quantidade real de bactéria inoculada nos animais.

3.14 Antibiograma

O antibiograma foi realizado nas bactérias obtidas das amostras de sangue dos animais pré-tratados com meropenem e PA.

3.14.1 Preparação do Inóculo

Realizou-se uma suspensão direta, em solução de cloreto de sódio a 0,9%, de colônias isoladas da placa de ágar com crescimento de 24 horas em ágar Mueller-Hinton ou ágar Sangue. A suspensão é ajustada para que sua turbidez coincida com a da solução padrão de McFarland 0,5 (NCCLS, 2003).

3.14.2 Plaqueamento em Ágar Mueller-Hinton

Mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, girou-se firmemente várias vezes contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido para retirar qualquer excesso de inóculo no swab. A superfície seca da placa de ágar Mueller-Hinton foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar. Repete-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo (NCCLS, 2003).

3.14.3 Aplicação dos Discos nas Placas de Ágar Inoculadas

Os discos de antibióticos utilizados foram: Meropenem (10 μ g), Vancomicina (30 μ g), Clindamicina (2 μ g), Ceftriaxona (30 μ g), Estreptomomicina (10 μ g) e Ampicilina (10 μ g). Estes foram colocados na superfície de uma placa de ágar previamente semeada. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato

completo com a superfície do ágar. Os discos foram distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não excedesse 24mm. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 37° C (NCCLS, 2003).

3.14.4 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

Após 18hs de incubação, examinou-se cada placa, com exceção dos halos de vancomicina que foram avaliados com 24 horas.

Os diâmetros dos halos foram medidos em milímetros, incluindo o tamanho dos discos, usando uma régua, que foi encostada na parte de posterior da placa de petri invertida. O halo de inibição foi considerado pela área sem crescimento bacteriano detectável a olho nu (NCCLS, 2003).

3.14.5 Análise dos resultados

A sobrevivência dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes e o teste X^2 foi utilizado para determinar as diferenças entre as curvas de sobrevivência. Os demais resultados serão expressos com média \pm EPM e foram analisados pela Variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para a determinação da significância entre os grupos, sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Implementação do Modelo de Pancreatite Aguda pela Obstrução do Ducto Biliopancreático

Segundo Meyerholz e Samuel (2007) o modelo de obstrução do ducto biliopancreático é útil na investigação das fases iniciais e evolução da PA, pois mimetiza a etiologia da obstrução por cálculos biliares. A figura 5 abaixo mostra a sobrevida dos animais submetidos à obstrução do ducto biliopancreático.

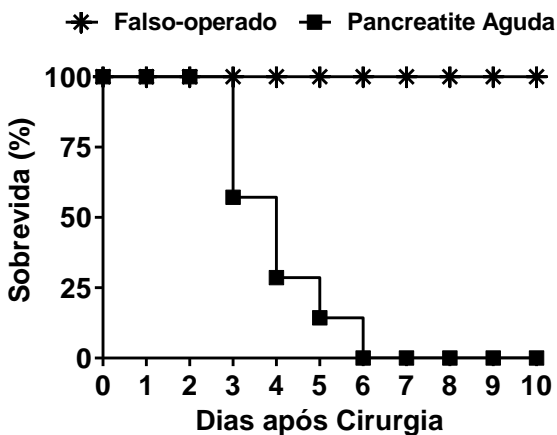


Figura 5. Sobrevida dos camundongos C57BL/6 após indução da pancreatite aguda. Os camundongos foram submetidos à indução da pancreatite aguda ou falso-operados pelo modelo de obstrução do ducto biliopancreático. A taxa de sobrevida foi monitorada por 10 dias. Os resultados foram expressos em percentual de sobrevida. * $p < 0,05$ quando comparado ao falso-operado, FO e PA (n = 6).

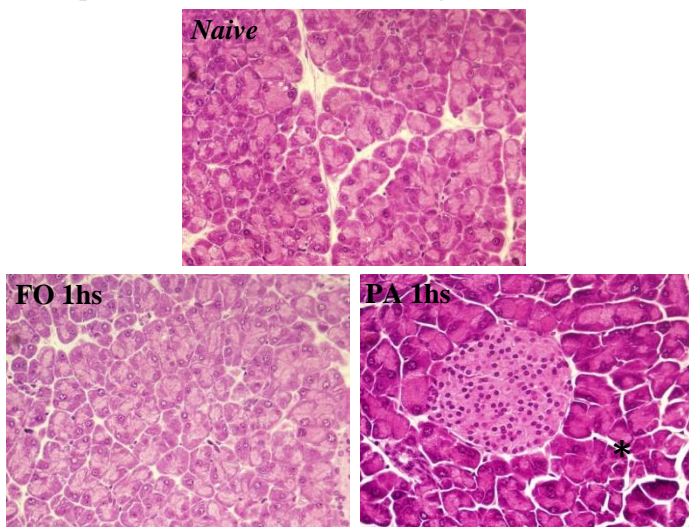
Com objetivo de compreender as alterações histológicas iniciais que ocorreram durante a indução da PA os animais foram sacrificados 1, 4 e 24hs após a cirurgia, coletando-se o tecido pancreático. Foram avaliados edema, infiltrado inflamatório e necrose, com score variando de normal (0), leve (†), moderado (††) e intenso (†††), conforme resultados demonstrados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Alterações morfológicas no tecido pancreático após indução da pancreatite aguda.

| Grupo | Edema | Necrose | Infiltrado Inflamatório |
|--------------|-------|---------|-------------------------|
| <i>Naive</i> | 0 | 0 | 0 |
| FO 1h | 0 | 0 | 0 |
| FO 4h | † | 0 | 0 |
| FO 24h | † | 0 | † |
| PA 1h | †† | 0 | † |
| PA 4h | †† | †† | †† |
| PA 24h | ††† | ††† | ††† |

Legenda: Score: Normal (0); Leve (†); Moderado (††); Intenso (†††).FO (falso-operado), PA (pancreatite aguda). Utilizado como teste estatístico moda. *Naive*, FO e PA (n = 4).

As fotos dos tecidos pancreáticos dos animais FO e PA, nos três tempos avaliados estão abaixo na figura 6.



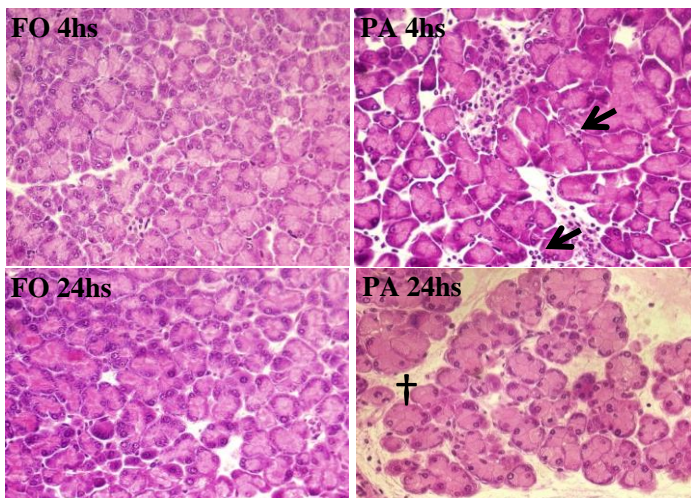
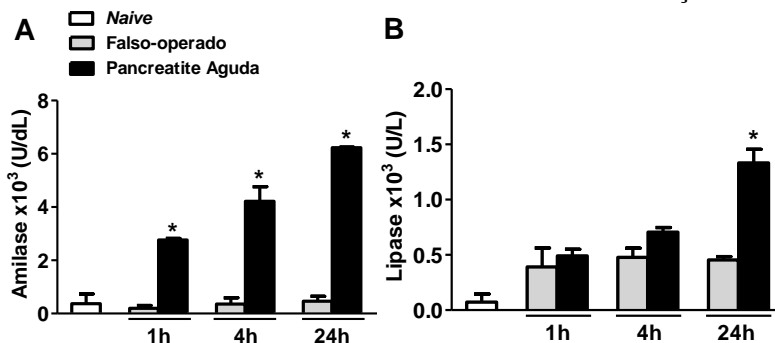


Figura 6. Alterações morfológicas no tecido pancreático de camundongos C57BL/6 após indução da pancreatite aguda. Os tecidos foram avaliados 1, 4 e 24 horas após a indução da doença. Os parâmetros avaliados foram edema, necrose e infiltrado inflamatório. A classificação da lesão histológica variou de leve (†) a intenso (†††). Naive, Falso-operado (FO) e Pancreatite Aguda (PA), (H&E, 400x). * Edema, † Infiltrado inflamatório, ‡ Necrose.

As figuras 7A, B, C e D mostram a quantificação de amilase, lipase, fosfatase alcalina e bilirrubina direta, respectivamente. Os dois primeiros parâmetros avaliados estão geralmente elevados quando ocorre inflamação do pâncreas, sendo utilizados como principais marcadores bioquímicos nesta condição. A fosfatase alcalina e a bilirrubina direta são verificadas como marcadores de obstrução biliar.



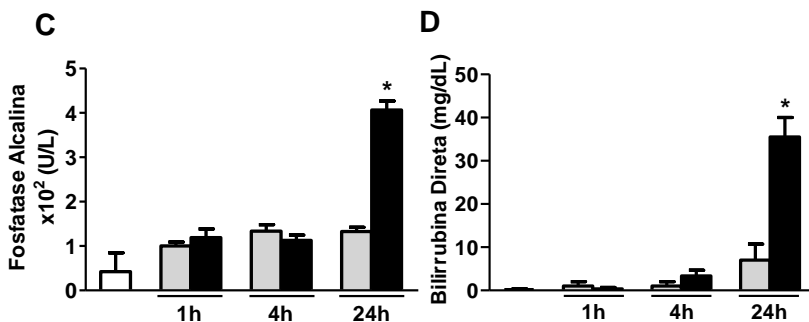
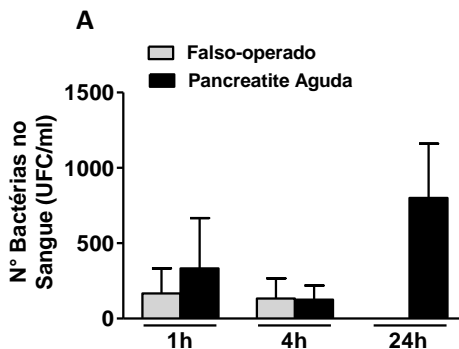


Figura 7. Medida da atividade enzimática de amilase, lipase, fosfatase alcalina e bilirrubina direta em camundongos C57BL/6. Estas dosagens enzimáticas foram avaliadas 1, 4 e 24 horas após a indução da pancreatite aguda. O método empregado para avaliação das concentrações foi o colorimétrico de ponto final. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo falso operado correspondente. *Naive* (n = 4), falso-operado e pancreatite aguda (n = 6).

A obstrução do ducto biliopancreático acarreta na redução da motilidade intestinal. Esta estase do conteúdo luminal no intestino delgado faz com que ocorra um aumento na população bacteriana e no contato destas bactérias com o epitélio intestinal, favorecendo a translocação bacteriana (LI et al., 1993; MOODY et al., 1995). Portanto, amostras de sangue (figura 8A) e lavado peritoneal (figura 8B) foram retiradas dos animais 1, 4 e 24h após a indução da PA para avaliação da translocação bacteriana pela presença de bactérias nestes locais.



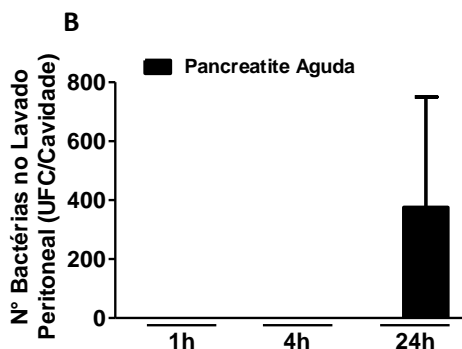


Figura 8. Camundongos C57BL/6 apresentam bactérias no sangue e lavado peritoneal após indução da pancreatite aguda. A quantificação bacteriana foi realizada 1, 4 e 24 horas após a indução da pancreatite aguda, as UFC foram contadas após o plaqueamento em ágar Mueller-Hinton e incubação a 37°C, por 24 horas (A e B). Falso-operado e pancreatite aguda (n = 4 cada).

Na PA pode ocorrer acúmulo de exsudato inflamatório na região peritoneal, constituído principalmente de neutrófilos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias. Este exsudato é denominado líquido de ascite (MIKAMI et al., 2002). Portanto, a figura 9 abaixo mostra a avaliação da presença de leucócitos na cavidade peritoneal 1, 4 e 24h após a PA.

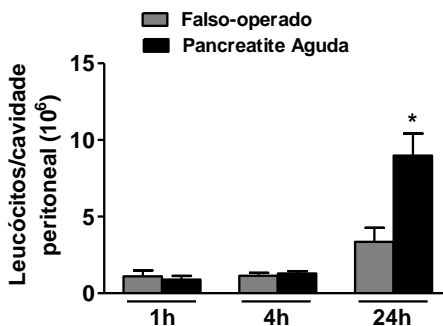


Figura 9. Recrutamento de leucócitos para cavidade peritoneal nos camundongos C57BL/6 após indução da pancreatite aguda. A contagem de leucócitos no lavado peritoneal foi realizado 1, 4 e 24 horas após a obstrução do ducto biliopancreático. *p < 0,05 quando comparado ao grupo falso operado e pancreatite aguda 1h e 4h. Falso-operado e pancreatite aguda (n = 4).

O modelo de obstrução do ducto biliopancreático em camundongos C57BL/6 resultou em elevada taxa de mortalidade (100% após seis dias). Este resultado foi semelhante ao estudo de SAMUEL et al. (2010) onde os animais apresentaram 100% de mortalidade após cinco dias de indução da PA pelo mesmo modelo. No estudo de YUAN et al. (2011) o intervalo da mortalidade foi de um a seis dias. No terceiro dia (50% de mortalidade) os autores verificaram um pico de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no soro e LBA, presença de neutrófilos no LBA e lesão hepática. No quarto dia ocorreu pico de hipotensão, bradicardia, infiltração pulmonar de neutrófilos, e lesão renal.

Este padrão precoce de disfunção orgânica e elevada mortalidade dentro de poucos dias é muito semelhante aos pacientes que apresentam PA grave. Estudos clínicos têm mostrado que 40-60% das mortes relacionadas com PA grave ocorrem dentro dos primeiros sete dias de internação (DE BEAUX; PALMER; CARTER, 1995; KARIMGANI et al., 1992; ISENMANN et al., 2001; MCKAY et al., 1999; TENNER et al., 1997) e que a insuficiência dos órgãos quando precoce e presente no momento da internação eleva o risco de falência progressiva resultando em morte. ISENMANN e colaboradores (2001) mostraram que a falência de órgãos desenvolveu e progrediu, em cerca de 80% dos pacientes, no início da PA grave, apesar de serem admitidos no hospital três dias após o início dos sintomas e de receberem tratamento intensivo.

A PA grave, também denominada de PA necrosante, está relacionada com alterações precoces e intensas no tecido pancreático (FIERS et al., 1999). Na avaliação histológica do pâncreas após uma hora da indução da doença foi verificado edema moderado e leve infiltrado inflamatório misto perivascular; quatro horas após a indução da doença observamos presença de edema, infiltrado inflamatório focal e necrose moderados; e vinte e quatro horas após edema, infiltrado inflamatório e necrose pancreática intensos, sendo que o infiltrado inflamatório passou de focal para difuso pelo tecido.

As alterações morfológicas encontradas 1 e 4hs no tecido pancreático, como edema intersticial e infiltrado inflamatório, foram similares as descritas por Meyerholz e Samuel (2007) e Samuel et al. (2010) utilizando o mesmo modelo de indução da PA. As alterações verificadas 24hs também foram semelhantes ao referido estudo descritas

como elevado edema evidenciado por espaços entre os ácinos e interstício perilobular, e o infiltrado celular estendeu-se para o parênquima pancreático após 24 horas.

Os animais FO apresentaram edema leve a partir de 4hs da cirurgia e 24hs após edema e infiltrado inflamatório leve, sem necrose tecidual. Estas alterações são semelhantes às encontradas no estudo de Catena e colaboradores (2009), sendo decorrentes da manipulação do tecido pancreático.

A lesão das células pancreáticas rapidamente induz uma reação inflamatória local, sendo que o edema tecidual é uma das primeiras alterações histológicas que ocorrem devido ao aumento da permeabilidade vascular (NORMAN, 1998).

A inflamação inicial é amplificada com a produção local de mediadores pró-inflamatórios, os quais induzem o recrutamento de neutrófilos com infiltração inicial nas regiões perivasculares do pâncreas. A lesão das células endoteliais aumenta a permeabilidade microvascular permitindo a passagem de neutrófilos e macrófagos para o interstício (DUGERNIER et al., 2003; MAYER et al., 2000; SATOH et al., 1999).

A maioria dos pacientes que desenvolvem PA leve a moderada apresentam alterações histológicas reversíveis (TOYAMA et al., 1996). Entretanto, pacientes que desenvolvem PA grave apresentam destruição intensa das células acinares, posteriormente tornando-se necrótico (FIERS et al., 1999).

Na destruição das células acinares ocorre a liberação das enzimas digestivas pancreáticas, como amilase e lipase, elevando-se consequentemente no soro (FROSSARD; HADENGUE, 2001). Neste estudo, a amilase aumentou rapidamente no soro dos animais uma hora após a indução da PA permanecendo elevada até 24hs. A lipase aumentou significativamente 24hs após a indução da PA. Os resultados da amilase obtidas em nossos experimentos corroboram com os resultados encontrados por Manso, Ramudo e De Dios (2007) que obtiveram elevação desta enzima 12 e 24 horas após a indução da PA por obstrução do ducto biliopancreático.

A amilase sérica é o marcador mais comumente utilizado na prática clínica, sendo que uma quantidade elevada de atividade da amilase sérica, pelo menos, três vezes o limite superior do normal, confirma o diagnóstico de PA. A sua atividade aumenta rapidamente

durante as primeiras 12hs após o início dos sintomas e retorna ao normal no prazo de três a cinco dias. No entanto, a atividade da lipase aumenta mais tarde no soro e permanece elevada durante um período maior, podendo variar de 8 a 14 dias (MATULL; PEREIRA; O'DONOHUE, 2006).

A elevação sérica de bilirrubina direta (JOHNSON, 2001) e fosfatase alcalina (WANG et al., 2001) ocorre em condições onde o fluxo biliar da vesícula para o intestino delgado apresenta-se interrompido. O resultado obtido com a obstrução do fluxo biliar neste modelo de indução de PA foi de aumento da bilirrubina direta e fosfatase alcalina 24hs após a cirurgia. Manso, Ramudo e De Dios (2007) também verificaram elevação da bilirrubina somente 24hs após a obstrução.

A interrupção do fluxo biliar provoca o crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado (NIEUWENHUIJS et al., 2000) e a exclusão de proteases pancreáticas no lúmen altera a permeabilidade intestinal (COHEN et al., 2004; DEITCH et al., 2003) favorecendo a translocação bacteriana. Portanto, as bactérias presentes nas infecções pancreáticas consistem principalmente de organismos entéricos (LUMSDEN; BRADLEY, 1990), mas o mecanismo principal pelo qual estes microrganismos atingem o pâncreas ainda é desconhecido. Evidências clínicas e experimentais sugerem que as bactérias entéricas podem atingir o pâncreas e outros órgãos pela via hematogênica (WEBSTER et al., 1979), linfática (WARSHAW, 1974), ou vias transmurais, bem como através da bile contaminada (KONOK; THOMPSON, 1969).

No modelo de PA utilizado neste estudo a bacteremia estava presente 1, 4 e 24hs após a indução da doença e somente 24hs após bactérias foram cultivadas do LP destes animais. Os animais FO apresentaram bacteremia 1 e 4hs após a cirurgia, sendo que a laparotomia, por si só, não causou contaminação na cavidade peritoneal.

RUNKEL e colaboradores (1991) encontraram bactérias em 100% dos linfonodos mesentéricos de animais 48 h após a PA e 21,5% em animais controles (FO) que passaram pela manipulação intestinal, sem a obstrução do ducto biliopancreático. As bactérias intestinais encontradas nos linfonodos foram *E. coli*, *Klebsiela pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Noventa e seis horas após as mesmas foram encontradas posteriormente em órgãos distantes (fígado, baço,

pâncreas) e sangue, exceto nos FO. A translocação bacteriana destes microrganismos entéricos ocorreu do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos (via linfática) para posterior disseminação hematogênica (RUNKEL; RODRIGUES; MOODY, 1995). Essa via de translocação linfática também foi verificada por Redan e colaboradores (1990) que demonstraram que o acesso de bactérias para a corrente sanguínea ocorre através dos vasos linfáticos. Como neste presente estudo foram avaliadas somente bactérias no sangue e lavado peritoneal, se faz necessário maiores análises para definir qual a via de disseminação destas bactérias.

O recrutamento de leucócitos para o lavado peritoneal foi verificado as 24hs. Neste mesmo tempo ocorreu a presença de bactérias no LP. Estes resultados corroboram aos encontrados por Mikami e colaboradores (2002).

4.2 Tratamento com Meropenem na Pancreatite Aguda Experimental

A PA grave apresenta uma elevada taxa de mortalidade ($\approx 30\%$) (HEINRICH et al., 2006), sendo que a infecção da necrose pancreática piora o prognóstico destes pacientes e triplica esta taxa (SWAROOP; CHARI; CLAIN, 2004). O uso de antibiótico profilático é baseado na coerência de que a redução da infecção pancreática pode diminuir a morbidade e mortalidade. Embora muita atenção tenha sido dada à possibilidade de prevenção ou tratamento da PA grave, os benefícios da profilaxia antibiótica ainda permanecem controversos (JIANG et al., 2012).

Dessa forma avaliamos o tratamento com meropenem, um antibiótico utilizado clinicamente na prevenção da infecção do pâncreas e que possui boa penetração chegando a concentrações terapêuticas suficientes no tecido necrosado (HEINRICH et al., 2006; SAGLAMKAYA et al., 2002).

A figura 10A mostra as taxas de sobrevida do pré-tratamento com meropenem. A figura 10B mostra as taxas de sobrevida do tratamento com meropenem.

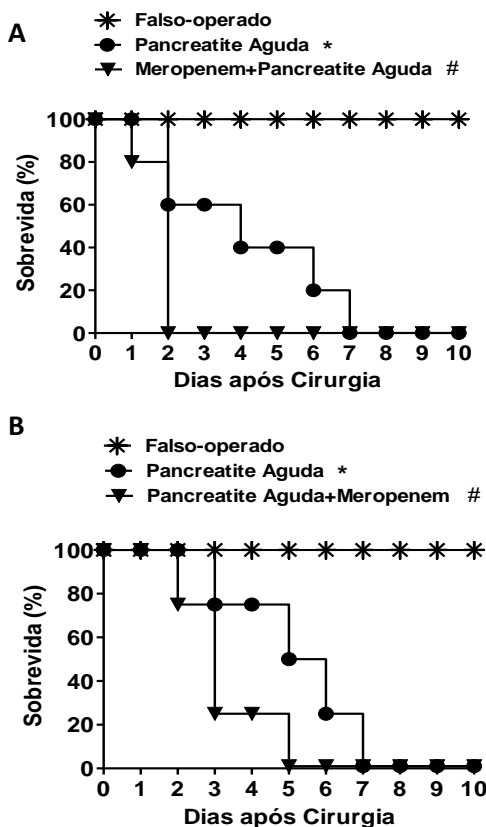
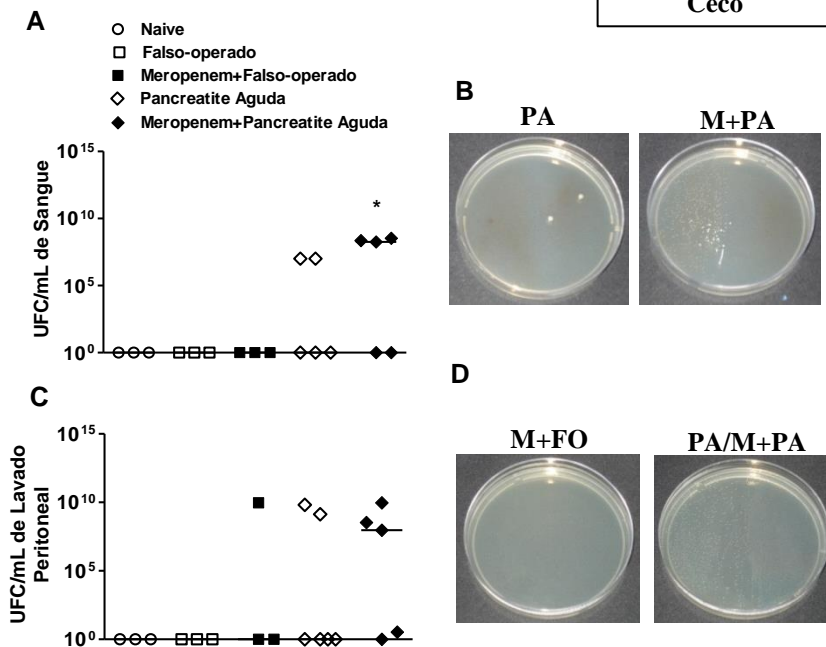
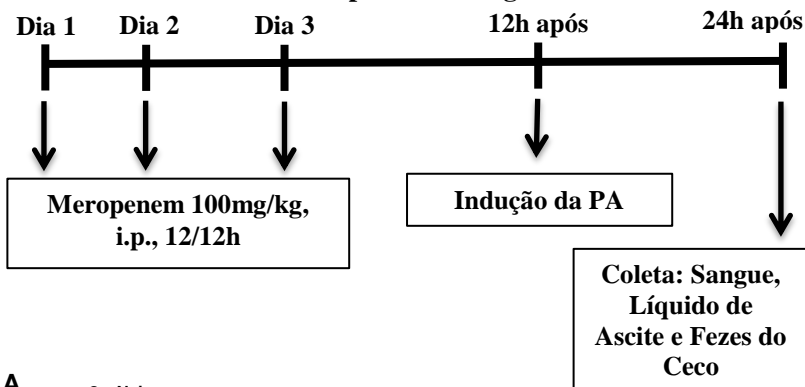


Figura 10. Sobrevida dos camundongos C57BL/6 no tratamento com meropenem e indução da pancreatite aguda. No pré-tratamento os camundongos foram tratados com Meropenem 100mg/kg (i.p.), de 12-12 horas, por três dias. Após 12 horas da última administração do antibiótico foi realizada a indução da pancreatite aguda (A). O pós-tratamento com Meropenem 100mg/kg (i.p.), de 12-12 horas, por três dias, iniciou após 12 horas da obstrução do ducto biliopancreático nos camundongos. A taxa de sobrevivida foi monitorada por 10 dias. Os resultados foram expressos em percentual de sobrevivida. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo falso operado. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo falso operado e pancreatite aguda. Falso-operados e pancreatite aguda ($n = 6$).

Para compreender o que o pré-tratamento com meropenem causou realizou-se o mesmo tratamento, 12hs após induziu-se a PA e 24hs após coletou-se sangue, líquido de ascite (LP) e fezes do ceco.

As figuras 11A, 11C e 11E mostram a contagem bacteriana no sangue, lavado peritoneal e fezes do ceco, respectivamente.

Protocolo experimental figura 11.



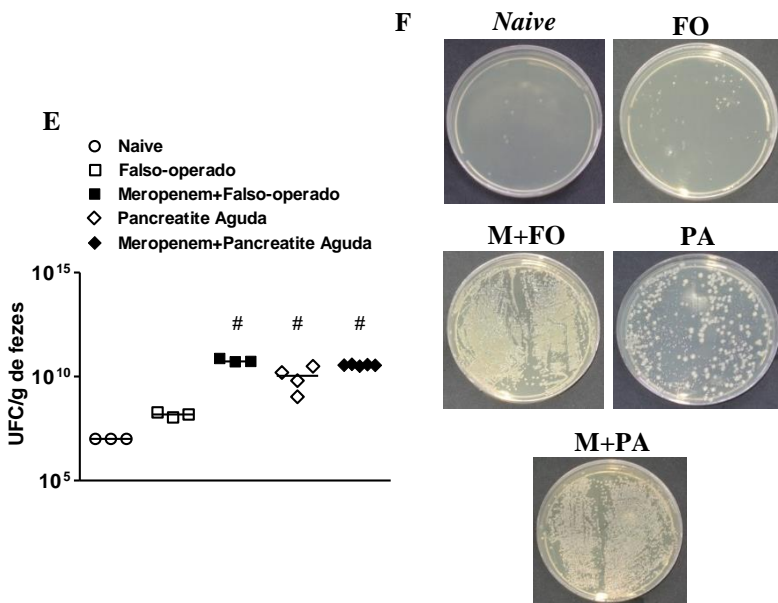


Figura 11. Pré-tratamento com meropenem modificou o perfil bacteriano nas amostras de sangue, líquido de ascite e fezes do ceco dos camundongos C57BL/6. O tratamento com meropenem foi realizado na dosagem de 100mg/kg (i.p.), de 12-12h, por três dias. Após 12 h realizou-se a obstrução do ducto biliopancreático e 24 h após realizou-se a coleta de sangue, líquido de ascite e fezes do ceco. Os gráficos representam os resultados do crescimento bacteriano em ágar sangue em condições de aerobiose e as fotos das placas de cultura representam o crescimento bacteriano em ágar Mueller-Hinton em condições de aerobiose. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos *Naive*, falso operado, meropenem+falso operado e pancreatite aguda. # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo falso operado. *Naive*, falso-operados e meropenem+falso-operados ($n = 3$), pancreatite aguda e meropenem+pancreatite aguda ($n = 6$).

Surpreendentemente o pré e pós-tratamento com meropenem aceleraram a mortalidade dos animais. No pré-tratamento, enquanto os animais somente com PA morreram gradativamente a partir do segundo dia após a cirurgia, os animais tratados com meropenem no mesmo período apresentaram 100% de mortalidade. No quinto dia após a indução da PA os animais no pós-tratamento com meropenem

apresentavam 0% de sobrevivência, comparando-se com 50% dos animais somente com PA.

Estudos utilizando indução de PA pelo modelo de obstrução do ducto biliopancreático em murinos avaliando o pré-tratamento e pós-tratamento com meropenem não foram encontrados. Portanto, faz-se necessário a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com outros modelos de PA.

Fritz e colaboradores (2008) utilizaram ácido glicodeoxicólico sob pressão + ceruleína para indução de PA em ratos, seis horas após iniciou o tratamento com meropenem 40mg/kg (i.v., 8/8hs) até completar 24hs (denominado tratamento profilático), após este período os animais foram eutanasiados. Neste estudo a mortalidade dos animais com PA foi de 57,1% em 24hs, com o tratamento do meropenem a mortalidade diminuiu a 0%. Nos animais com PA e eutanasiados 72hs após obtiveram 42,9% de mortalidade. Em outro regime de tratamento, iniciado 24hs após a PA (denominado tratamento terapêutico), os animais foram eutanasiados 72hs após o início do tratamento e a mortalidade foi de 27,3%; com o tratamento iniciado seis horas após a PA e eutanasiados 24 e 72h obtiveram 0% de mortalidade (FRITZ et al., 2008). Estes dados de redução da mortalidade dos animais com PA e tratados com meropenem são contrários aos encontrados no presente estudo. Isto pode ter ocorrido devido as diferenças metodológicas (indução da PA, animais utilizados, dose e administração do antibiótico).

Os animais com PA, neste estudo, apresentaram 40% de bacteremia, 33,3% de bactérias presentes no LP e 100% de aumento da contagem de bactérias nas fezes do ceco, 24hs após a indução da PA. Os animais com PA pré-tratados com meropenem apresentaram bactérias no sangue e LP. Em relação ao ceco, ocorreu crescimento acentuado de bactérias nas fezes tanto nos FO quanto PA.

A translocação bacteriana é promovida por diversos fatores, tais como, alteração da microbiota intestinal local, comprometimento da barreira da mucosa intestinal, e prejuízo das defesas imunológicas (BERG, 1992). Pelo menos dois destes três fatores são encontrados juntos na PA e poderiam ser os responsáveis sinergicamente pela translocação bacteriana (RUNKEL et al., 1991).

A translocação bacteriana fisiológica ocorre continuamente em animais sadios a uma taxa muito baixa, e o hospedeiro pode eliminar

essas bactérias invasoras. Em uma primeira etapa de translocação, as bactérias estão presentes nos nódulos linfáticos mesentéricos (MLN), mas não se espalham sistemicamente para outros órgãos. Na segunda fase, as bactérias expandem-se a partir da MLN para outros locais, tais como o fígado, baço e rim. A terceira etapa ocorre quando a bactéria se espalha sistemicamente para a cavidade peritoneal e na corrente sanguínea e pode resultar em choque séptico (BERG, 1992).

O tratamento com meropenem alterou o perfil bacteriano nas amostras do ceco, observa-se esta alteração na figura 10F, que corresponde as imagens das placas com crescimento das amostras de fezes do ceco. Os animais somente com PA apresentavam dois tipos de colônias bacterianas, uma grande amarelada em maior quantidade e outra menor esbranquiçada, sendo que as amostras dos animais pré-tratados com meropenem, tanto do grupo FO quanto PA apresentaram predomínio das colônias menores esbranquiçadas.

O tratamento com antibiótico pode alterar o equilíbrio entre células de mamíferos e bactérias, fazendo com que as alterações na composição da microbiota intestinal, possam conduzir a um desequilíbrio homeostático através de alterações na expressão das proteínas de junção e oclusão presentes entre as células epiteliais intestinais, na mucina, peptídeos antimicrobianos, e citocinas. A desregulação da homeostase entre os mamíferos e seus simbiontes intestinais demonstra que predis põem o hospedeiro à translocação bacteriana (WLODARSKA; FINLAY, 2010). Esta translocação pode ser observada pelo aumento de bactérias no sangue e LP dos animais pré-tratados com meropenem (Figura 10A e 10C).

Nas amostras de sangue, LP e ceco ocorreu aumento na contagem de bactérias nos animais com PA. Esta elevação pode ser devido as alterações proporcionadas pelo modelo de obstrução do ducto biliopancreático, pois o mesmo diminui a motilidade intestinal, afetando a microbiota intestinal pela inibição do complexo mioelétrico migratório (LI et al., 1993) proporcionando crescimento excessivo de bactérias no lúmen do intestino delgado (LEE; PIMENTEL, 2006; LIN, 2004). A ocorrência do crescimento excessivo de bactérias é positivamente correlacionada com a gravidade da pancreatite (VAN FELIUS et al., 2003).

4.3 Identificação e Avaliação da Susceptibilidade a Antimicrobianos das Bactérias Encontradas nas Amostras de Sangue dos Animais com Pancreatite Aguda e Pré-tratados com Meropenem

Foi encontrado crescimento de bactérias nos diferentes meios de cultura plaqueados (ágar Sangue e Mueller-Hinton) e nas diferentes condições de crescimento (aerobiose e anaerobiose) conforme descrito no quadro 3 abaixo.

Tabela 3. Bactérias encontradas nas amostras de sangue coletadas nos animais com pancreatite aguda pré-tratados com meropenem.

| Bactéria | Meio de Cultura e Condição de Crescimento | Característica da Colônia |
|-----------------|--|----------------------------------|
| FMC012004 | Ágar MH em Anaerobiose | Branca |
| FMC012005 | Ágar MH em Anaerobiose | Transparente |
| FMC012017 | Ágar MH em Anaerobiose | Branca |
| FMC012009 | Ágar SG em Anaerobiose | Branca |
| FMC012027 | Ágar SG em Anaerobiose | Branca |
| FMC012028 | Ágar SG em Anaerobiose | Branca |
| FMC012173 | Ágar MH em Aerobiose | Branca |
| FMC012174 | Ágar MH em Aerobiose | Transparente |
| FMC012175 | Ágar MH em Aerobiose | Branca |
| FMC012177 | Ágar SG em Aerobiose | Branca |

Legenda: MH – Ágar Mueller Hinton; SG – Ágar Sangue

Estas amostras foram submetidas ao teste de antibiograma pelo método de disco-difusão frente ao antibiótico meropenem. As

mostras FMC012005, FMC012009, FMC012027, FMC012028, FMC012174 e FMC012177 apresentaram-se resistentes ao antibiótico, sendo que as amostras FMC012004, FMC012017, FMC012173 e FMC012175 apresentaram-se sensíveis.

As bactérias resistentes passaram por outro teste de antibiograma para verificar a resistência ou sensibilidade destas a outros antibióticos. Foram testados discos de clindamicina (lincosamida), ceftriaxona (cefalosporina), estreptomina (aminoglicosídeo), vancomicina (glicopeptídeo) e ampicilina (β -lactâmico).

Todas estas bactérias apresentaram resistência a clindamicina, ceftriaxona e estreptomina além da resistência ao meropenem. No entanto, apresentaram suscetibilidade a ampicilina e vancomicina como pode ser verificado na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Antibiograma realizado com as amostras bacterianas resistentes ao meropenem.

| Bactéria | MPM (mm) | CLI (mm) | CRO (mm) | EST (mm) | VAM (mm) | AMP (mm) |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| FMC012005 | 19 (R) | 09 (R) | 08 (R) | 11 (R) | 17 (I) | 30 (S) |
| FMC012009 | 11 (R) | 10 (R) | 0 (R) | 17 (R) | 18 (I) | 28 (S) |
| FMC012027 | 19 (R) | 08 (R) | 08 (R) | 10 (R) | 18 (I) | 29 (S) |
| FMC012028 | 19 (R) | 09 (R) | 08 (R) | 10 (R) | 21 (I) | 29 (S) |
| FMC012174 | 19 (R) | 09 (R) | 0 (R) | 10 (R) | 17 (I) | 25 (S) |
| FMC012177 | 19 (R) | 09 (R) | 08 (R) | 10 (R) | 21 (I) | 29 (S) |

Legenda: MPM (meropenem); CLI (clindamicina); CRO (ceftriaxona); EST (estreptomina); VAM (vancomicina); AMP (ampicilina); mm (milímetros); R (resistente); S (sensível); I (intermediário).

A identificação destas bactérias multirresistentes foi realizada obtendo-se os seguintes resultados: cocos gram-positivos, prova da catalase negativa, no crescimento em ágar Sangue obteve-se colônias pequenas esbranquiçadas com alfa ou gama-hemólise, crescimento em caldo NaCl 6,5% positivo, crescimento em ágar bile esculina positivo e resistência a optoquina.

A partir destes resultados obtidos verificou-se que as amostras eram *Enterococcus spp*, sendo que a partir da identificação da espécie bacteriana pelo Cartão de Identificação de Cocos Gram-positivos (Vitex[®] 2, bioMérieux, França) pode-se verificar que todas as

amostras de bactérias multirresistentes eram de *Enterococcus gallinarum*.

Em animais, utilizando diferentes modelos de PA (ácido glicodeoxicólico+ceruleína e taurocolato de sódio), as principais bactérias encontradas, em amostras sanguíneas, foram *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e *Enterococcus* spp (gram-positiva); no tecido pancreático necrosado foram *E. coli* (gram-negativa) e *Enterococcus* spp. (FRITZ et al., 2008; SCHWARZ et al., 2000). Em humanos com PA, o espectro bacteriano, identificado em amostras de sangue e tecido pancreático, consiste principalmente de gram-negativas, mas também incluem enterococos, estafilococos e anaeróbios (BEGER et al., 1986; LUMSDEN; BRADLEY, 1990; RAU; BEGER, 1997). Em relação ao *E. gallinarum*, em um estudo avaliando o perfil bacteriano no sangue de pacientes, 44.6% das amostras o enterococos estava associada com bacteremia polimicrobiana e 76.8% a porta de entrada, para esta bactéria, foi pelo trato biliar (CHOI et al., 2004).

Embora, normalmente, presentes no trato gastrointestinal, os enterococos se destacam como patógenos oportunistas em infecção hospitalar (NOSKIN; PETERSON; WARREN, 1995). A maioria dos casos infecciosos são pelos *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (MASUKI, 2008), sendo que o *E. gallinarum* tem sido identificado em casos esporádicos de infecção humana (MASCHIETO et al., 2004; NEVES et al., 2009). Alterando a complexidade da microbiota comensal intestinal com antibióticos de amplo espectro proporciona uma oportunidade para os microrganismos, de outro modo inócuos, causar doença sistêmica como, por exemplo, os enterococos (DONSKEY et al., 2000; PULTZ et al., 2005; KELLY et al., 1994).

Paralelamente ao aumento da incidência de infecções causadas por enterococos, observa-se rápido aumento na frequência de cepas resistentes aos antimicrobianos de uso corrente (WILLEY et al., 1994; ELIOPOULOS, 1993) como vancomicina, β -lactâmicos, e aminoglicosídeos (COURVALIN, 1990; HANDWERGER et al., 1992; RHINEHART et al., 1990; TENOVER, 1991).

Neste estudo, a metodologia utilizada para avaliação da sensibilidade das amostras bacterianas resistentes ao meropenem, frente a outros antibióticos, como, clindamicina, ceftriaxona, estreptomicina, vancomicina e ampicilina foi de disco-difusão. Os resultados obtidos mostram que todas as amostras foram resistentes à clindamicina,

ceftriaxona, estreptomicina, e sensíveis à ampicilina. Nesse contexto, o *E. gallinarum* é caracterizado pela resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina (LECTERCQ et al., 1992; MASCHIETO et al., 2004; VINCENT et al., 1991). Segundo NCCLS (2003), amostras bacterianas com halos maiores ou iguais a 17 mm correspondem a bactérias sensíveis à vancomicina, os resultados obtidos em relação à sensibilidade da vancomicina foram valores próximos a este.

Estudos de ensaios de disco-difusão demonstram que os mesmos não conseguem detectar alguns enterococos resistentes à vancomicina, principalmente a resistência intrínseca (SWENSON; HILL; THORNSBERRY, 1989; SAHM; OLSEN, 1990). Entretanto, Tenover et al. (1993) demonstram que este teste pode apresentar bons resultados quando utilizado adequadamente, devendo ser realizado com muita cautela e controle rígido de qualidade, do contrário, poderá falhar na detecção de amostras de enterococos resistentes. Estudos também documentaram falhas nos sistemas de testes automatizados (Vitek, MicroScan) para detectar enterococos com baixo nível de resistência à vancomicina (SAHM; OLSEN, 1990; TENOVER et al., 1993, WILLEY et al., 1992).

Segundo Jones et al. (1995), Sader e Pignatari (1994) e Tenover et al. (1993) o E-test é uma excelente metodologia para a avaliação da sensibilidade de enterococos a antimicrobianos. Além de apresentar alta sensibilidade, é um teste de fácil realização e que fornece, com precisão, a concentração inibitória mínima (MIC).

Fenotipicamente os enterococos que possuem o gene van-A possuem alto nível de resistência à vancomicina e a teicoplanina, a presença do gene van-B caracteriza-se pela resistência à vancomicina, mas sensibilidade à teicoplanina. Estes genes são encontrados geralmente no *E. faecium* e *E. faecalis* (ELIOPOULOS, 1993). O fenótipo van-C é caracterizado pela resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina encontrado principalmente em *E. gallinarum* (LECTERCQ et al., 1992; MASCHIETO et al., 2004; VINCENT et al., 1991). Primeiramente somente o gene van-C era encontrado no *E. gallinarum*. No entanto, a aquisição de genes van-A ou van-B tem sido descritos (DUTKA-MALEN et al., 1994).

Há poucos relatos de infecções por *E. gallinarum* van-A ou van-B positivo e poucos dados em relação à sua importância clínica. Foram relatados dois casos de sepsse por *E. gallinarum* van-A-positivos

(BIAVASCO et al., 2001; MERQUIOR et al., 2008), dois surtos na Argentina (CORSO et al., 2005) e no Brasil (NEVES et al., 2009). No Brasil, o primeiro caso de colonização por *E. gallinarum* portador do gene van-A foi detectado em 2002 em um hospital localizado no estado do Rio Grande do Sul (CAMARGO et al., 2004) e o primeiro caso de infecção clínica, também detectada em 2002, no estado do Rio de Janeiro (MERQUIOR et al., 2008).

O consumo de agentes antimicrobianos é um forte indicador de aquisição de microrganismos multirresistentes (HARTHUG et al., 2002). Em um estudo realizado por Batistão e colaboradores (2012) observou-se em pacientes das unidades de terapia intensiva (UTI) elevada prevalência de colonização por enterococos vancomicina resistentes fenótipo van-C, sendo que os antibióticos utilizados nestes pacientes foram carbapenêmicos e vancomicina. Assim, a correlação positiva entre a incidência e o consumo de vancomicina e carbapenêmicos na UTI sugerem que a prevalência do uso de antibióticos é um fator de risco importante, particularmente para o surgimento e disseminação de enterococos vancomicina resistentes (EVR) (BATISTÃO et al., 2012).

Bergan, Nord e Thorsteinsson (1991) realizaram um estudo com objetivo de avaliar o uso de meropenem na microbiota intestinal, os voluntários saudáveis receberam 500 mg de meropenem (i.v.) de 8/8hs durante sete dias. As amostras de fezes foram coletadas antes, durante e após a administração de meropenem. O número de enterobactérias e de estreptococos diminuiu durante o período de administração, enquanto que o número de enterococos aumentou. A microbiota intestinal voltou ao normal em todos os voluntários no prazo de duas semanas após o fim da administração de meropenem (BERGAN; NORD; THORSTEINSSON, 1991).

4.4 Avaliação da patogenicidade do *Enterococcus gallinarum*

Para determinar se o *E. gallinarum* é suficiente para causar doença quando inoculado em um camundongo saudável esta bactéria foi administrada por via intravenosa nas concentrações de $1,6 \times 10^8$ UFC, $6,4 \times 10^8$ UFC e 5×10^9 UFC, tanto bactéria viva quanto morta pelo calor a 60°C por 30 minutos (figura 12A). As figuras 12B, C, D e E mostram a presença da bactéria no baço, fígado, sangue e lavado broncoalveolar,

respectivamente, após inoculação por via intravenosa de 5×10^9 UFC de *E. gallinarum* viva.

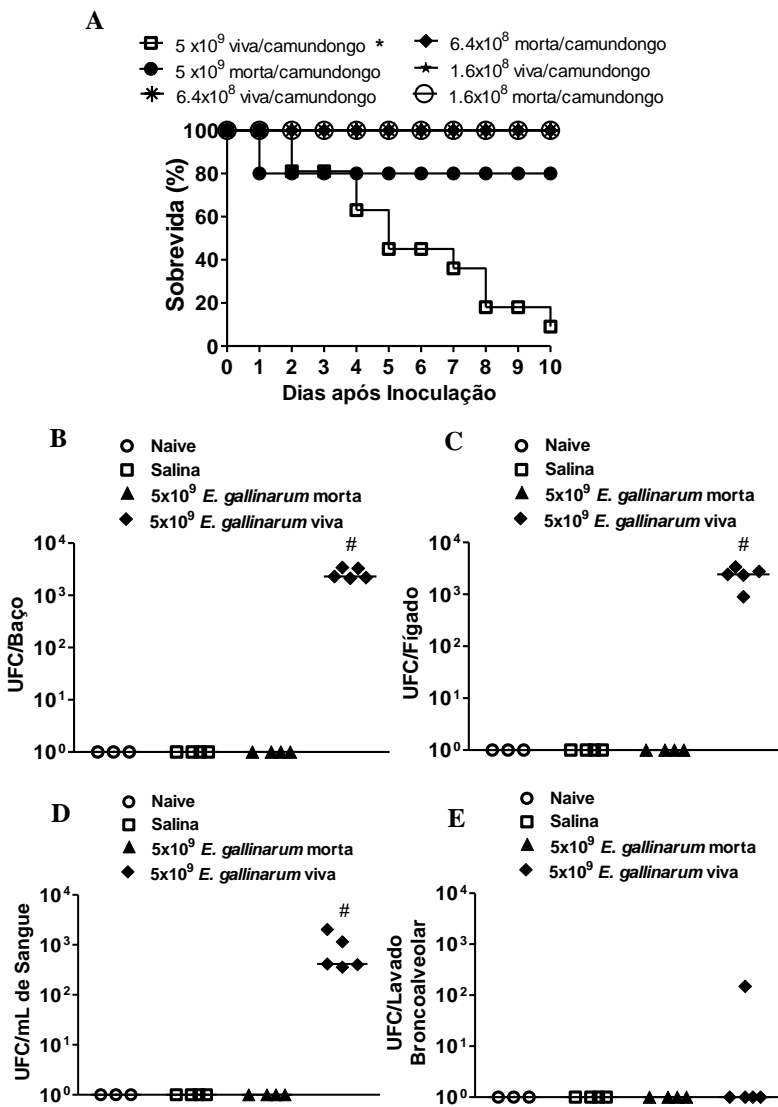
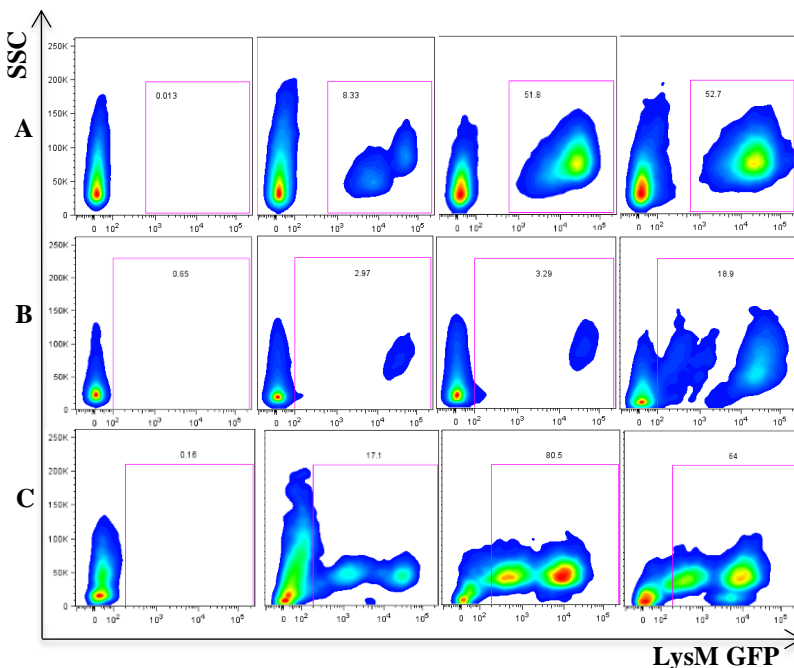


Figura 12: *Enterococcus gallinarum* causa mortalidade em camundongos C57BL/6 quando inoculado vivo na dosagem de 5×10^9 UFC/ml. O *E. gallinarum* foi inoculado pela via endovenosa em diferentes concentrações $1,6 \times 10^8$ UFC/animal, $6,4 \times 10^8$ UFC/animal e 5×10^9 UFC/animal, sendo inoculada tanto viva quanto morta (A). A taxa de sobrevivência foi monitorada por 10 dias. Os resultados foram expressos em percentual de sobrevivência ($n = 5$). Após 12 horas da inoculação de 5×10^9 UFC/animal recuperou-se a bactéria no sangue, lavado broncoalveolar, baço e fígado dos camundongos. * $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos. # $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos. Naive ($n = 3$), Salina e 5×10^9 UFC *E. gallinarum* morta ($n = 4$), 5×10^9 UFC *E. gallinarum* viva ($n = 5$).

A figura 13 mostra que o *Enterococcus gallinarum* quando administrado (i.v.) em camundongos Lys-M eGFP foi capaz de ativar neutrófilos e macrófagos, no sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.



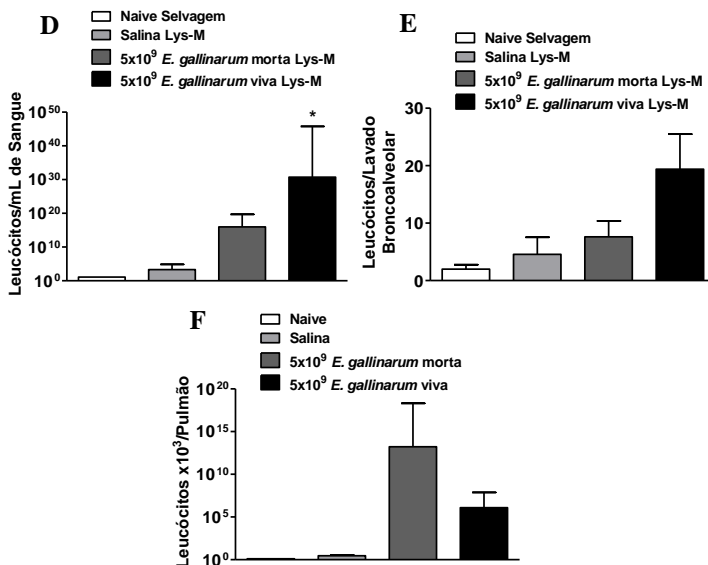


Figura 13: Ativação de leucócitos Lys-M eGFP pelo *Enterococcus gallinarum*. Após 12 horas da inoculação de *E. gallinarum* coletou-se dos camundongos sangue (A, D), lavado broncoalveolar (B, E) e pulmões (C, F). Estas amostras foram processadas para leitura no citômetro de fluxo. * $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos. Naive (n = 3), salina, 5x10⁹ *E. gallinarum* moorta e viva (n = 6).

O *E. gallinarum* foi injetado (i.v.) em animais Lys-M eGFP e 3 horas após iniciou-se o tratamento com ampicilina (figura 14), o antibiótico que essa bactéria apresentou sensibilidade no teste *in vitro*.

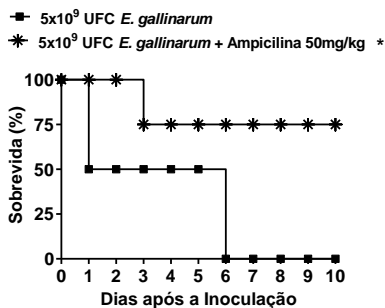


Figura 14: Tratamento com ampicilina reduz mortalidade de camundongos Lys-M e-GFP inoculados com *Enterococcus gallinarum*. Três horas após a inoculação os animais foram tratados com Ampicilina. Foi utilizado uma dose de ataque inicial de 100mg/kg por via subcutânea, 12 horas após iniciou-se o tratamento com ampicilina na dose de 50mg/kg, sendo administrado a cada 12 horas, por três dias (n = 5 cada). *p < 0,05.

A figura 15 mostra o tratamento com ampicilina nos animais pré-tratados com meropenem e induzidos PA.

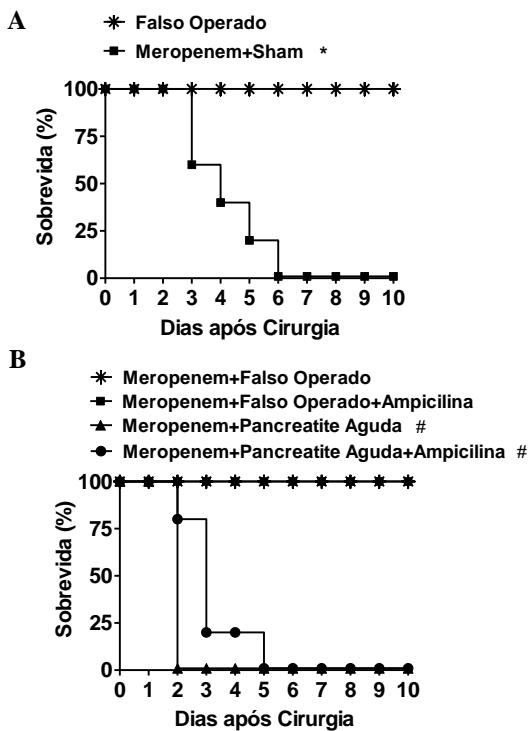


Figura 15: Tratamento com ampicilina reduz mortalidade de camundongos Lys-M e-GFP pré-tratados com meropenem e indução de pancreatite aguda. Animais pré-tratados com meropenem, 12 horas após a última administração do antibiótico realizou-se a indução da pancreatite aguda, três horas após a cirurgia iniciou-se pós-tratamento com ampicilina na dose de ataque de 100mg/kg e depois tratamento com 50mg/kg, 12-12 horas, por três dias. A sobrevivência foi monitorada por 10 dias. Os resultados foram expressos em percentual de

sobrevida ($n = 5$). * $p < 0,05$ quando comparado ao falso operado. # $p < 0,05$ quando comparado aos grupos meropenem + falso operado e meropenem + falso operado + ampicilina.

Os animais que receberam a bactéria viva e morta nas doses de $1,6 \times 10^8$ UFC, $6,4 \times 10^8$ UFC não apresentaram mortalidade (figura 11A). Todavia, os animais que receberam a dose de 5×10^9 UFC de bactérias vivas foram susceptíveis verificando-se pela diminuição da sobrevida e os que receberam a bactéria morta nesta mesma dose obtiveram mortalidade de 20%. Os resultados das figuras 11B, C, D e E mostram que o *E. gallinarum* foi capaz de colonizar diferentes tecidos, como baço e fígado, após sua inoculação, assim como, sangue e lavado broncoalveolar.

Os camundongos foram susceptíveis ao desafio sistêmico com a bactéria viva como indicado pelo aumento da mortalidade, apresentando uma cinética de morte semelhante aos animais com PA. Além disso, o *E. gallinarum* foi recuperado, após inoculação nos animais, nas amostras de sangue, baço, fígado e lavado broncoalveolar. Assim, em relação aos postulados de Koch, uma infecção sistêmica com *E. gallinarum* viva é suficiente para recapitular a mortalidade associada com a PA induzida pela obstrução do ducto biliopancreático.

Os postulados de Koch foram criados como uma tentativa de estabelecer um padrão para a evidência de causalidade em doenças infecciosas. Estes consistem resumidamente em: (a) o parasita ocorre nos casos da doença em questão, e em circunstâncias que podem explicar as alterações patológicas e o curso clínico da doença; (b) depois de ser completamente isolado do corpo e repetidamente cultivado em cultura pura, o parasita pode provocar novamente a doença. Alguns pesquisadores têm acrescentado mais um postulado que consiste no reisolamento do microrganismo experimentalmente inoculado (FREDERICKS; RELMAN, 1996).

A figura 12 mostra que o *Enterococcus gallinarum* quando administrado (i.v.) em camundongos Lys-M eGFP foi capaz de ativar neutrófilos e macrófagos, tanto no sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.

A lisozima-M (Lys-M) é uma enzima presente em macrófagos e neutrófilos, utilizada como marcador induzível destas células (KESHAV et al., 1991) e possui função de lisar a parede

bacteriana de bactérias gram positivas (SCHEINECKER et al., 1995). Em contraste aos neutrófilos que secretam predominantemente lisozima pré-formada, os macrófagos possuem a habilidade de a ressintetizar (GORDON; TODD; COHN, 1974). O gene Lys-M está funcionalmente envolvido no desenvolvimento da linhagem mielocítica e é essencial na diferenciação de granulócitos e monócitos (SCHEINECKER et al., 1995).

A degradação do peptidoglicano da parede celular é realizada pela lisozima através da hidrólise da ligação glicosídica entre ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG). O peptidoglicano é o componente da parede celular das bactérias que proporciona forma e rigidez mecânica, sendo que sua lise não mata diretamente as bactérias, mas as tornam altamente suscetíveis ao estresse osmótico e mecânico (GANZ et al., 2003).

A figura 13 mostra que o tratamento com ampicilina diminuiu a mortalidade de 100% no sexto dia após a inoculação do *E. gallinarum* para 25%. Esta redução da mortalidade também ocorreu quando os animais foram pré-tratados com meropenem, induzidos PA e pós-tratados com ampicilina. A mortalidade de 100% no segundo dia apresentada pelos animais pré-tratados com meropenem e com PA foi reduzida para 25% no mesmo período quando comparado aos animais pré-tratados com meropenem, com PA e pós-tratamento com ampicilina (Figura 14B).

A redução na mortalidade com o tratamento da ampicilina apresentada nas figuras 13 e 14B ocorreram provavelmente devido a diminuição sistêmica do *E. gallinarum* nos animais, pois esta bactéria, segundo o teste *in vitro*, foi sensível à ampicilina.

Ayres, Trinidad e Vance (2012) e Rakoff-Nahoum e colaboradores (2004) obtiveram em seus estudos resultados semelhantes. Estes consistiram no tratamento com antibióticos (ampicilina, vancomicina, neomicina e metronidazol) de animais com colite induzida por DSS a 5% onde estes obtiveram maior mortalidade que os animais somente com DSS. No estudo de Ayres, Trinidad e Vance (2012) foi identificado um patobionte multirresistente após o tratados com os antibióticos. No entanto, o mesmo era sensível a estreptomomicina e quando os animais com DSS foram tratados com este antibiótico a mortalidade diminuiu, sendo que esta bactéria foi eliminada nas fezes do intestino delgado, ceco e cólon destes animais.

A microbiota intestinal é composta por espécies microbianas comensais que proporcionam benefícios metabólicos, nutricionais e imunológicos a seus hospedeiros (LEY; PETERSON; GORDON, 2006; ROUND; MAZMANIAN, 2009). Estas bactérias luminais comensais são uma parte predominante da microbiota, e contribuem para a função digestiva intestinal, influenciam no metabolismo epitelial e estimulam a proliferação de células epiteliais e a imunidade do intestino, bem como competem e suprimem os agentes patogênicos entéricos (LUPP, et al. 2007; STECHER; HARDT, 2011; KEENEY; FINLAY, 2011).

As bactérias comensais podem, direta ou indiretamente, promover a resistência à colonização bacteriana patogênica (ASHIDA et al., 2011). Como por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, induz RegIII γ , que atua seletivamente contra bactérias gram-positivas pela ligação à superfície exposta do peptidoglicano. Em contraste, o ácido lipoteicóico (LTA), um glicolípido de superfície predominante de bactérias gram-positivas, não induz RegIII γ (BRANDL et al., 2008). Isso sugere que as bactérias que pertencem a diferentes classes podem travar batalhas umas contra as outras através da indução de mecanismos inatos antimicrobianos na mucosa de mamífero (SONNENBURG et al., 2006). RegIII γ é uma lectina secretada com atividade bactericida potente contra bactérias gram-positivas, que são expressas por células epiteliais intestinais e células de Paneth (CASH et al., 2006).

O epitélio intestinal utiliza também múltiplos mecanismos de defesa contra microrganismos, incluindo a microbiota luminal, camada de muco, integridade epitelial, troca de células epiteliais e respostas imunes inatas ou adquiridas (KIM et al., 2010).

Os antibióticos têm sido amplamente utilizados para alvejar seletivamente bactérias patogênicas, para tratar e prevenir muitas doenças infecciosas. A administração de antibióticos de amplo espectro comprometem as defesas imunes inatas do intestino, eliminando os microrganismos comensais, diminuindo a expressão de moléculas antimicrobianas (RegIII γ) na mucosa intestinal (BRANDL et al., 2008), promovendo o aparecimento de patobiontes resistentes a antibióticos (LEVY; MARSHALL, 2004; MARRA, 2006), incluindo patógenos gram-positivos como os enterococos vancomicina resistentes (EVR). O RegIII γ possui um importante papel na defesa do hospedeiro contra o

EVR, eliminando-os no lúmen do intestino delgado (BRANDL et al., 2008; CASH et al., 2006; HOOPER et al., 2003). Na eliminação da microbiota comensal ocorre o aparecimento de nichos intestinais proporcionando maior acesso aos nutrientes, aumentando assim a sobrevivência e proliferação do EVR (DONSKEY, 2004).

Durante a década passada, o gênero *Enterococcus* tornou-se um patógeno emergente tanto nas infecções hospitalares quanto nas adquiridas na comunidade (LOW et al., 2001). Os enterococos são microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas e que frequentemente causam infecções em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo e/ou que receberam múltiplas terapias antimicrobianas (CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; DAHLÉN, et al. 2000; REIS, et al., 2001).

O principal reservatório humano dos enterococos é o trato gastrointestinal, porém ele pode ser encontrado, embora com menos frequência, na cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina (KONEMAN et al., 2001). Também podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, como pássaros e insetos (TEIXEIRA; FACKLAM, 2007a). Porém tornaram-se importantes agentes de doenças humanas devido, principalmente, a sua resistência a agentes antimicrobianos (KONEMAN et al., 2001).

A maior parte das infecções por enterococos origina-se da microbiota normal do paciente, embora os microrganismos possam também ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (MURRAY; BARON, 2007).

O terceiro tipo mais comum de infecção causada por enterococos é bacteremia (MOELLERING, 1998) e é provável que a infecção sistêmica seja resultado da difusão a partir do intestino (DONSKEY, 2004). Em relação ao *E. gallinarum*, em um estudo avaliando o perfil bacteriano no sangue de pacientes, 44.6% das amostras o enterococos estava associada com bacteremia polimicrobiana e 76.8% a porta de entrada, para esta bactéria, foi pelo trato biliar (CHOI et al., 2004).

A sobrevivência do gênero enterococos no ambiente hospitalar deve à sua resistência intrínseca a vários antibióticos utilizados comumente, e, talvez, mais importante ainda seja sua habilidade de adquirir resistência aos antibióticos empregados

atualmente, seja por mutação ou recebendo material genético através de plasmídeos e transposons. Os enterococos apresentam resistência intrínseca a moderadas concentrações de aminoglicosídeos, o que ocorre em todas as espécies e decorre de uma baixa penetração do antimicrobiano pela parede bacteriana (TEIXEIRA; FACKLAM, 2007b).

A terapia antimicrobiana para as infecções causadas por enterococos é complicada porque a maioria dos antibióticos não tem efeito bactericida em concentrações clinicamente relevantes. Dessa forma, as infecções enterocócicas sistêmicas são comumente tratadas com um agente que atue na parede celular (um betalactâmico, como a ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina) e um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina). Esses agentes atuam sinergicamente para promover a ação bactericida. Entretanto a resistência aos aminoglicosídeos, à ampicilina, à penicilina e à vancomicina tem se tornado um importante problema, contribuindo para a redução das opções de tratamento (ROSMARI et al., 2005).

5. CONCLUSÕES

O modelo de indução de PA pela obstrução do ducto biliopancreático em murinos está associado com elevada taxa de mortalidade. A utilização do meropenem tanto no pré, como no pós-tratamento surpreendentemente acelerou a mortalidade nos animais, proporcionando, também, o crescimento e disseminação do patobionte multirresistente a antibióticos, *Enterococcus gallinarum*, durante a pancreatite aguda experimental. Estudos complementares são necessários para definição da sobreposição desta bactéria sobre outras presentes na microbiota intestinal, além da sua via de disseminação e mecanismo de patogenicidade.

REFERÊNCIAS

ASHIDA, H. et al. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. **Nat Chem Biol.**, v. 8; n. 1, p. 36-45, 2011.

AYRES, J. S.; TRINIDAD, N. J.; VANCE, R. E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 799-806, 2012.

BALTHAZAR, E. J. et al. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. **Radiology**, v. 174, p. 331-36, 1990.

BANKS, P. A. Practice guidelines in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 92, p. 377-86, 1997.

BARON, T. H.; MORGAN, D. E. Acute necrotizing pancreatitis. **N Engl J Med**, v. 340, p. 1412-7, 1999.

BASSI, C. et al. Behaviour of antibiotics during human necrotizing pancreatitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 4, p. 830-6, 1994.

BASSI, C. Infected pancreatic necrosis. **Int J Pancreatol**, v. 16, p. 1-10, 1994.

BASSI, C.; LARVIN, M.; VILLATORO, E. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, 2003.

BATISTÃO, D. W. et al. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 57-63, 2012.

BECKER, C. E.; O'NEILL, L. A. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. **Semin Immunopathol**, v. 29, p. 239-48, 2007.

BEGER, H. G. et al. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. **Gastroenterology**, v. 91, p. 433-8, 1986.

BENIFLA, M.; WEIZMAN, Z. Acute pancreatitis in childhood: analysis of literature data. **J Clin Gastroenterol.**, v. 37, n. 2, p. 169-72, 2003.

BENTREM, D. J.; JOEHL, R. J. Pancreas: healing response in critical illness. **Crit Care Med**, v. 31, p. 582-9, 2003.

BERG, R. D. Translocation of enteric bacteria in health and disease. *Curr Stud* **Hematol Blood Transfus**, v. 59, p. 44-65, 1992.

BERGAN, T.; NORD, C. E.; THORSTEINSSON, S. B. Effect of meropenem on the intestinal microflora. **Eur J Clin Microbiol Infect**

BIAVASCO, F. et al. Recovery from a single blood culture of two *Enterococcus gallinarum* isolates carrying both vanC-1 and vanA cluster genes and differing in glycopeptide susceptibility. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, p. 309-14, 2001.

BONFIGLIO, G.; RUSSO, G.; NICOLETTI, G. Recent developments in carbapenems. **Exp Opin Invest Drugs**, v. 11, p. 529-44, 2002.

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

BRADLEY, E. L. Management of infected pancreatic necrosis by open drainage. **Ann Surg**, v. 206, p. 542-50, 1987.

BRANDL et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. **Nature**, v. 455, p. 804-7, 2008.

BRITISH SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY. United Kingdom guidelines for the management of acute pancreatitis. **Gut**, v. 42, p. 1-13, 1998.

BUCHLER, M. et al. Human pancreatic tissue concentration of bactericidal antibiotics. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1902-8, 1992.

CAMARGO, I. L. et al. Enterococcus gallinarum carrying the vanA gene cluster: first report in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 1669-71, 2004.

CAMPOS et al. Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 5, p. 304-10, 2008.

CASH, H. L. et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science**, v. 313, p. 1126-30, 2006.

CENTINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, s. 4, p. 686-707, 2000.

CHOI, S. H. et al. Clinical features and outcomes of bacteremia caused by Enterococcus casseliflavus and Enterococcus gallinarum: analysis of 56 cases. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 1, p. 53-61, 2004.

CHOW, J.; MAZMANIAN, S. K. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. **Cell Host Microbe**, v. 7, p. 265-76, 2010.

CICALESE, L. et al. Acute pancreatitis and bacterial translocation. **Dig Dis Sci**, v. 46, p. 1127-32, 2001.

CLAVIEN, P. A. et al. Acute pancreatitis and normoamylasemia. Not an uncommon combination. **Ann Surg**, v. 210, p. 614-20, 1989.

COHEN, D.B. et al. Pancreatic duct ligation reduces lung injury following trauma and hemorrhagic shock. **Ann Surg**, v. 240, n. 5, p.

CONSTANTINESCU et al. Gallstone disease in young population: incidence, complications, therapeutic approach. **Chirurgia**, v. 107, n. 5, p. 579-82, 2012.

CORSO, A. et al. First report of VanA Enterococcus gallinarum dissemination within an intensive care unit in Argentina. **Int J Antimicrob Agents**, v. 25, p. 51-6, 2005.

COURVALIN, P. Resistance of enterococci to glycopeptides. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 34, p. 2291-6, 1990.

DAHLÉN, G. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, p. 309-12, 2000.

DE BEAUX, A. C.; PALMER, K. R.; CARTER, D. C. Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases. **Gut**, v. 37, n. 1, p. 121-6, 1995.

DEITCH, E.A. et al. Serine proteases are involved in the pathogenesis of trauma-hemorrhagic shock induced gut and lung injury. **Shock**, v. 19, n. 5, p. 452-56, 2003.

DELANEY, C. P. et al. Pancreatic atrophy: a new model using serial intra peritoneal injections of L-arginine. **Scand J Gastroenterol**, v. 28, p.1086-90, 1993.

DIEHL, A. K. et al. Gallstone size and risk of pancreatitis. **Arch Intern Med**, v. 157, p. 1674-78, 1997.

DONSKEY, C. J. et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin resistant enterococci in the stool of colonized patients. **N Engl J Med**, v. 343, p. 1925-32, 2000.

DONSKEY, C. J. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. **Clin Infect Dis**, v. 39, p. 219-26, 2004.

DRUSANO, G. Meropenem: laboratory and clinical data. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, p. 51-9, 1997.

DUGERNIER, T. et al. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, p. 148-57, 2003.

DUTKA-MALEN, S. et al. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, p. 1675-7, 1994.

ELIOPOULOS, G. M. Increasing problems in the therapy of enterococcal infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 12, p. 409-12, 1993.

FAGENHOLZ, P. et al. National study of United States emergency department visits for acute pancreatitis, 1993–2003. **BMC Emerg Med**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2007.

FAZAR, M. H.; GOLDBERG, E. Acute abdominal pain. **Med Clin North Am**, v. 90, p. 481-503, 2006.

FERREIRA, M. et al. Increased lipase and amilase levels in critically ill patients. Retrospective study. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 20, n. 4, p. 362-9, 2008.

FIERS, W. et al. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene**, v. 18, p. 7719-30, 1999.

FIGARELLA, C. et al. Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens: activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen 1. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 369, p. 293-8, 1988.

FOITZIK, T. et al. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? **Int J Colorectal Dis**, v. 15, n. 3, p. 127-35, 2000.

FREDERICKS, D. N.; RELMAN, D. A. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. **Clin Microbiol Rev**. v 9 n 1 p 18-33 1996

FRITZ, S. et al. Prophylactic antibiotic treatment is superior to therapy on demand in experimental necrotizing pancreatitis. **Crit Care**, v. 12, n. 6, p. 1-9, 2008.

FROSSARD, J. L et al. Choledocholithiasis: a prospective study of common bile duct stone migration. **Gastrointest Endosc**, v. 51, p. 175-9, 2000.

FROSSARD, J. L.; STEER, M. L.; PASTOR, C. M. Acute pancreatitis. **Lancet**, v. 371, p. 143-52, 2008.

GANZ, T. et al. Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2388-92, 2003.

GOLUB, R.; SIDDIQI, F.; POHL, D. Role of antibiotics in acute pancreatitis: a meta-analysis. **J Gastrointest Surg**, v. 2, n. 6, p. 496–503, 1998.

GORDON, S.; TODD, J.; COHN, Z. A. In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. **J Exp Med**, v. 139, p. 1228-48, 1974.

GORELICK, F. S. Alcohol and zymogen activation in the pancreatic acinar cell. **Pancreas**, v. 27, p. 305-10, 2003.

GREENBAUM, L.; HIRSCHKOWITZ, A. Endogenous cathepsin activates trypsinogen in extracts of dog pancreas. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 107, p. 74 6, 1961.

GUYTON, A; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2006, 1115 p.

HANDWERGER, S. et al. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci. **Clin Infect Dis**,

HARTHUG, S. et al. The prevalence of faecal carriage of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals. **J Hosp Infect**, v. 50, n. 2, p. 145-54, 2002.

HEINRICH, S. et al. Evidence-based treatment of acute pancreatitis: a look at established paradigms. **Ann Surg**, v. 243, p. 154-68, 2006.

HOFBAUER, B. et al. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein induced pancreatitis in rats. **Am J Physiol**, v. 275, p. 352-62, 1998.

HOOPER, L. V; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, p. 1115-8, 2001.

HOQUE, R. et al. TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 358-69, 2011.

ISENMANN, R. et al. Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial. **Gastroenterology**, v. 126, p. 997-1004, 2004.

ISENMANN, R.; RAU, B.; BEGER, H. G. Early severe acute pancreatitis: characteristics of a new subgroup. **Pancreas**, v. 22, p. 274-8, 2001.

JIANG, K. et al. Present and future of prophylactic antibiotics for severe acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 3, p. 279-84, 2012.

JOHNSON, A. P. The pathogenicity of enterococci. **J Antimicrob Chemother**, v. 33, p. 1083-9, 1994.

JOHNSON, C. D. ABC of the upper gastrointestinal tract. Upper abdominal pain: Gall bladder. **Br Med J**, v. 323, p. 1170-3, nov., 2001.

JOHNSON, C. H.; STEPHENS, D. H.; SARR, M. G. CT of acute pancreatitis: correlation between lack of contrast enhancement and pancreatic necrosis. **Am J Roentgenol**, v. 156, p. 93-5, 1991.

JONES, R. N. et al. Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates: prevalence data from 97 medical center. Surveillance study in the United States. **Diag Microbiol Infect Dis**, v. 21, p. 85-93, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia basica**: texto, atlas. 10. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2004, 488 p.

KARIMGANI, I. et al. Prognostic factors in sterile pancreatic necrosis. **Gastroenterology**, n. 103, p. 1636-40, 1992.

KEENEY, K. M.; FINLAY, B. B. Enteric pathogen exploitation of the microbiotagenerated nutrient environment of the gut. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, p. 92-8, 2011.

KELLY, C. P.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J. T. Clostridium difficile colitis. **N Engl J Med**, v. 330, p. 257-62, 1994.

KEMPPAINEN, E. et al. Diagnosis of acute pancreatitis. **Ann Chir Gynaecol**, v. 87, p. 191-94, 1998.

KIM, M. et al. Bacterial interactions with the host epithelium. **Cell Host Microbe**, v. 8, p. 20-35, 2010.

KISHINO, Y.; KAWAMURA, S. Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v. 47, p. 147-55, 1984.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. São Paulo: MEDSI, 2001, 1465p.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 279-89, 2008.

KONOK, G. P.; THOMPSON, A.G. Pancreatic ductal mucosa as a protective barrier in the pathogenesis of pancreatitis. **Am J Surg**, v. 117, p. 18-23, 1969.

KRIMS, P. E.; PANDOL, S. J. Free cytosolic calcium and secretagogue stimulated initial pancreatic exocrine secretion. **Pancreas**, v. 3, p. 383-90, 1988.

KUBES, P.; MEHAL, W. Z. Sterile inflammation in the liver. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1158-7, 2012.

LAYER, P. et al. Therapy of acute pancreatitis. **Dt Arztebl**, v. 98, p. 3139-41, 2001.

LECLERCQ, R. et al. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 9, p. 2005 8, 1992.

LEE, H.; PIMENTEL, M. Bacteria and irritable bowel syndrome: the evidence for small intestinal bacterial overgrowth. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 8, p. 305 11, 2006.

LERCH, M. M.; AGHDASSI, A. A. The role of bile acids in gallstone-induced pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p. 429-33, 2010.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, v. 10, p. 122-9, 2004.

LEY, R. E; PETERSON, D. A; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, p. 837-48, 2006.

LI, Y. et al. Intestinal migrating myoelectric complexes in rats with acute pancreatitis and bile duct ligation. **J Surg Res**, v. 55, p. 182-7, 1993.

LIGHTNER, A. M.; KIRKWOOD, K. S. Pathophysiology of gallstone pancreatitis. **Front Biosci**. v. 6. p. 66-76. 2001.

- LIN, H. C. Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. **J Am Med Assoc**, v. 292, p. 852-8, 2004.
- LOMBARDI, B. Influence of dietary factors on the pancreatotoxicity of ethionine. **Am J Pathol**, v. 84, n. 3, p. 633-48, 1976.
- LOMBARDI, B.; ESTES, L. W.; LONGNECKER, D. S. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL ethionine fed with a choline-deficient diet. **Am J Pathol**, v. 79, n. 3, p. 465-80, 1975.
- LOW, D. E. et al. Enterococcus: pathogens of the 90s. **Eur J Surg Suppl**, v. 573, p. 19-24, 1994.
- LOW, D.E. et al. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Diseases*, v. 32, s. 2, p. 133-45, 2001.
- LUMSDEN, A.; BRADLEY, E.L. Secondary pancreatic infections: abscess, infected necrosis and infected pseudocyst. **Surg Gynecol Obstet**, v. 170, p. 459-67, 1990.
- LUNDBERG, A. H. et al. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. **Pancreas**, v. 21, p.41-51, 2000.
- LUPP, C. et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host Microbe**, v. 2, p. 119-129, 2007.
- MANSO, M. A.; RAMUDO, L.; DE DIOS, I. Extrapancreatic organ impairment during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. Effect of N-acetylcysteine. **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 5, p. 343-9, 2007.

MARAVI-POMA, E. et al. Early antibiotic treatment (prophylaxis) of septic complications in severe acute necrotizing pancreatitis: a prospective, randomized, multicenter study comparing two regimens with imipenem cilastatin. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 1974-80, 2003.

MARRA, A. Targeting virulence for antibacterial chemotherapy: identifying and characterising virulence factors for lead discovery. **Drugs R D.**, v. 7, p. 1-16, 2006.

MASCHIETO, A. et al. Antimicro-bial resistance of *Enterococcus* sp. Isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 763-7, 2004.

MATULL, W. R.; PEREIRA, S. P.; O'DONOHUE, J. W. Biochemical markers of acute pancreatitis. **J Clin Pathol**, v. 59, p. 340-44, 2006.

MAYER, J. et al. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. **Gut**, v. 47, p. 546-52, 2000.

MAYER, J. et al. Mechanism and role of trypsinogen activation in acute pancreatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 46, p. 2757-63, 1999.

MAYERLE, J.; SIMON, P.; LERCH, M. M. Medical treatment of acute pancreatitis. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 855-69, 2004.

MAZUSKI, J. E. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections and treatment. **Surg Infect**, v. 9, p. 567-71, 2008.

MCKAY, C. J. et al. High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-1995. **Br J Surg**, v. 86, p. 1302-5, 1999.

MERQUIOR, V. L. et al. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the *vanA* and *vanC1* genes. **J Med Microbiol**, v. 57, p. 244-5, 2008.

MEYERHOLZ, D. K.; SAMUEL, I. Morphologic characterization of early ligation induced acute pancreatitis in rats. **Am J Surg**, v. 194, n. 5, p. 652-8, 2007.

MIKAMI, Y. et al. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. **Surgery**, v. 132, n. 1, p. 86-92, 2002.

MINEN, F. et al. Acute and recurrent pancreatitis in children: exploring etiological factors. **Scand J Gastroenterol**, v. 47, n. 12, p. 1501-4, 2012.

MOELLERING, R. C. Jr. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Infect Dis**, v. 26, p. 1196-9, 1998.

MOODY, F.; HALEY-RUSSEL, D.; MUNCY, D. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis. **Dig Dis Sci**, v. 40, p. 1798-1804, 1995.

MOOREN, F. C. et al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. **J Biol Chem**, v. 278, p. 9361-9, 2003.

MURRAY, B. E. The life and times of the enterococcus. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, p. 46-65, 1990.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J. **Manual of clinical microbiology**. 9th. ed. Washington: ASM, 2007, 2488 p.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8, v. 23, n. 1, 2003.

NEVES, F. P. et al. Emergence of the vanA genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Ag**, v. 33, p. 211-5, 2009.

NIEDERAU, C. et al. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Methodology and standards. **Eur Surg Res**, v. 24, p. 40-54, 1992.

NIEDERAU, C.; FERRELL, L. D.; GRENDALL, J. H. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. **Gastroenterology**, v. 88, p. 1192-1204, 1985.

NIEUWENHUIJS, V. B. et al. Obstructive jaundice, bacterial translocation and indigestive small bowel motility in rats. **Digestion**, v. 62, p. 255-61, 2000.

NORDBACK, I. et al. Early treatment with antibiotics reduces the need for surgery in acute necrotizing pancreatitis--a single-center randomized study. **J Gastrointest Surg**, v. 5, n. 2, p. 113-8, 2001.

NORMAN, J. G. et al. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. **Surgery**, v. 120, p. 515-21, 1996.

NORMAN, J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Am J Surg**, v. 175, p. 76-83, 1998.

NOSKIN, G. A.; PETERSON, L. R.; WARREN, J. R. Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis bacteremia: acquisition and outcome. **Clin Infect Dis**, v. 20, p. 296-301, 1995.

OTANI, T. et al. Codistribution of TAP and the granule membrane protein GRAMP-92 in rat caerulein-induced pancreatitis. **Am J Physiol**, v. 275, p. 999-1009, 1998.

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

PEDERZOLI, P. et al. A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing

pancreatitis with imipenem. **Surg Gynecol Obstet**, v. 176, p. 480-3, 1993.

PULTZ, N. J. et al. Mechanisms by which anaerobic microbiota inhibit the establishment in mice of intestinal colonization by vancomycin-resistant Enterococcus. **J Infect Dis**, v. 191, p. 949-56, 2005.

RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, p. 229-41, 2004.

RATTNER, D. W. et al. Early surgical debridement of symptomatic pancreatic necrosis is beneficial irrespective of infection. **Am J Surg**, v. 163, p. 105-9, 1992.

RAU, B.; BEGER, H. G. Surgical treatment of infected necrosis. **World J Surg**, v. 21, p. 155-61, 1997.

REDAN, J. A. et al. Organ distribution of radiolabeled enteric Escherichia coli during and after hemorrhagic shock. **Ann Surg**, v. 211, n. 6, p. 663-6, 1990.

REID, K. C.; COCKERILL, F. R.; PATEL, R. Clinical and Epidemiological Features of Enterococcus casseliflavus/flavescens and Enterococcus gallinarum Bacteremia: A Report of 20 Cases. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 11, p. 1540-6, 2001.

REIS, A. et al. In vitro antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals, **Braz J Infec Dis**, v. 5, s. 5, p. 243-51, 2001.

RHINEHART, E. et al. Rapid dissemination of 3-lactamase-producing, aminoglycosideresistant Enterococcus faecalis among patients and staff of an infant-toddler surgical ward. **N. Engl. J. Med**, v. 323, p. 1814-18, 1990.

RICE, L. B; SHLAES, D. M. Vancomycin resistance in the enterococcus: relevance in pediatrics. **Pediatr Clin North Am**, v. 42, n. 3, p. 601-18, 1995.

RINDERKNECHT, H. et al. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. **Dig Dis Sci**, v. 31, p. 314-21, 1986.

ROSMARI, H. et al. Antimicrobial susceptibility among isolates of Enterococcus from Hospital Universitário de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 6, p. 391-5, 2005.

ROSS, S. O.; FORSMARK, C. E. Pancreatic and biliary disorders in the elderly. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 30, n. 2, p. 531-45, 2001.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 313-23, 2009.

RUNKEL, N. S. F. et al. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. **J Surg Res**, v. 51, p. 18-23, 1991.

RUNKEL, N. S.; RODRIGUES, L. F.; MOODY, F.G. Mechanisms of sepsis in acute pancreatitis in opossums. **Am J Surg**, v. 169, n. 2, p. 227-32, feb., 1995.

RUNZI, M. et al. Severe acute pancreatitis: nonsurgical treatment of infected necroses. **Pancreas**, v. 30, p. 195-9, 2005.

SADER, H. S; PIGNATARI, A. C. E test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing. **Sao Paulo Med J**, v. 12, p. 635-8, 1994.

SAGLAMKAYA, U. et al. Penetration of meropenem and cefepim into pancreatic tissue during the course of experimental acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 24, p. 264-8, 2002.

SAHM, D. F.; OLSEN, L. In vitro detection of enterococcal vancomycin resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, p.1846-8, 1990.

SAINIO, V. et al. Early antibiotic treatment in acute necrotising pancreatitis. **Lancet**, v. 346, p. 663-7, 1995.

SAKAGUCHI, Y. et al. Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms. **Pancreas**, v. 33, p. 371-81, 2006.

SALUJA, A. K. et al. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. **Gastroenterology**, v. 113, p. 304 10, 1997.

SAMUEL, I. et al. A novel model of severe gallstone pancreatitis: murine pancreatic duct ligation results in systemic inflammation and substantial mortality. **Pancreatology**, v. 10, n. 5, p. 536-44, 2010.

SAMUEL, I. et al. Bile and pancreatic juice replacement ameliorates early ligation-induced acute pancreatitis in rats. **Am J Surg**, v. 169, p. 391-9, 1995.

SARR, M. G. et al. Acute necrotizing pancreatitis: management by planned, staged pancreatic necrosectomy/debridement and delayed primary wound closure over drains. **Br J Surg**, v. 78, p. 576-81, 1991.

SATOH, A. et al. Ascitic fluid of experimental severe acute pancreatitis modulates the function of peritoneal macrophages. **Pancreas**, v. 19, p. 268-75, 1999.

SCHEINECKER, C. et al. Granulomonocyte-associated lysosomal protein expression during in vitro expansion and differentiation of CD34 hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 86, p. 4115-23, 1995.

SCHMID, S. W. et al. The role of infection in acute pancreatitis. **Gut**, v. 45, p. 311-6, 1999.

SCHWARZ, M. et al. Antibiotic use in necrotizing pancreatitis: results of a controlled study. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 122, p. 356-61, 1997.

SCHWARZ, M. et al. Frequency and time course of pancreatic and extrapancreatic bacterial infection in experimental acute pancreatitis in rats. **Surgery**, v. 127, n. 4, p. 427-32, 2000.

SCOGGINS, C. R. et al. p53-dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, p. 827-36, 2000.

SERPYTIS et al. Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis in pregnancy. **JOP.**, v. 13, n. 6, p. 677-80, 2012.

SHA, H.; MA, Q.; JHA, R. K. Trypsin is the culprit of multiple organ injury with severe acute pancreatitis. **Med Hypotheses**, v. 72, n. 2, p. 180-2, 2009.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v.7, p.151-85. 2005.

SMOTKIN, J.; TENNER, S. Clinical reviews: pancreatic and biliary disease: laboratory diagnostic tests in acute pancreatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 34, p. 459-62, 2002.

SONNENBURG, J. L.; CHEN, C. T.; GORDON, J. I. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. **PLoS Biol**, v. 4, p. 2213-26, 2006.

STANTEN, R.; FREY, C. F. Comprehensive management of acute necrotizing pancreatitis and pancreatic abscess. **Arch Surg**, v. 125, p. 1269-74, 1990.

STECHER, B.; HARDT, W. D. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, p. 82-91, 2011.

STEINBERG, W.; TENNER, S. Acute pancreatitis. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1198-1210, 1994.

STERNBY, B. et al. What is the best biochemical test to diagnose acute pancreatitis? A prospective clinical study. **Mayo Clin Proc**, v. 71, p. 1138-44, 1996.

SWAROOP, V. S.; CHARI, S. T.; CLAIN, J. E. Severe acute pancreatitis. **J Am Med Assoc**, v. 291, p. 2865-8, 2004.

SWENSON, J. M.; HILL, B. C.; THORNSBERRY, C. Problems with the disk diffusion test for detection of vancomycin resistance in enterococci. **J. Clin. Microbiol**, v. 27, n. 9, p. 2140-2, 1989.

SWENSSON, E.E.; MAULL, K. I. Clinical significance of elevated serum and urine amylase levels in patients with appendicitis. **Am J Surg**, v. 142, p. 667-70, 1981.

TANI, S. et al. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. **Dig Dis Sci**, v. 35, p. 367-74, 1990.

TEIXEIRA, L. M.; FACKLAM, R. Ra. Enterococcus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 9.ed. Washington: ASM, 2007, p. 422-33.

TEIXEIRA. L.M.; FACKLAM, R.Rb. Special phenotypic methods for detecting antibacterial Resistance, In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 9.ed. Washington: ASM, 2007, p. 2488.

TENNER, S. et al. Relationship of necrosis to organ failure in severe acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 113, p. 899-903, 1997.

TENOVER, F. C. et al. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 7, p. 1695-9, 1993.

TENOVER, F. C. Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. **Am J Med**, v. 91, p. 76-81, 1991.

TOH, S. K.; PHILLIPS, S.; JOHNSON, C. D. A prospective audit against national standards of the presentation and management of acute pancreatitis in the South of England. **Gut**, v. 46, n. 2, p. 239-43, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10. ed. Porto Alegre (RS): ARTMED, 2012, 934 p.

TOYAMA, M.T. et al. Ischaemia-reperfusion mechanisms in acute pancreatitis. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v. 219, p. 20-3, 1996.

UHL, W. et al. IAP guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 2, p. 565-73, 2002.

UK GUIDELINES. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. **Gut**, v. 54, p. 1-9, 2005.

VAN FELIUS, I. et al. Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. **Neurogastroenterol Motil**, v. 15, p. 267-76, 2003.

VAN LEEUWEN, P. A. et al. Clinical significance of translocation. **Gut**, v. 35, p. 28-34, 1994.

VAN MINNEN, L. et al. The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis. **J Gastrointest Surg**, v. 11, n. 5, p. 682-9, 2007.

VINCENT, S. et al. Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. **J Clin Microbiol**, v. 29, p. 2335-7, 1991.

WANG, H. H. et al. New insights into the molecular mechanisms underlying effects of estrogen on cholesterol gallstone formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 11, p. 1037-47, 2009.

WANG, C. H. et al. Rapid diagnosis of choledocholithiasis using biochemical tests in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. **Hepatogastroenterology**, v. 48, p. 618-21, 2001.

WARSHAW, A.L. Inflammatory masses following acute pancreatitis. Phlegmon, pseudocyst, and abscess. **Surg Clin Norrh Am**, v. 54, p. 621-36, 1974.

WEAVER, C.; BISHOP, A. E.; POLAK, J. M. Pancreatic changes elicited by chronic administration of excess L-arginine. **Exp Mol Pathol**, v. 60, p. 71-87, 1994.

WEBSTER, M.W. et al. Postinduction bacteremia in experimental acute pancreatitis. **Am J Surg**, v. 138, p. 418-20, 1979.

WERLIN, S. L.; KUGATHASAN, S.; FRAUTSCHY, B. C. Pancreatitis in children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 37, n. 5, p. 591-5, 2003.

WHITCOMB, D. Ca. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. **Gut**, v. 45, p. 317-22, 1999.

WHITCOMB, D. Cb. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 116, p. 770-2, 1999.

WHITCOMB, D. C. et al. Hereditary pancreatitis is caused by mutation in the cationic trypsinogen gene. **Nat Genet**, v. 14, p. 141-5, 1996.

WIDDISON, A. L.; KARANJIA, N. D. Pancreatic infection complicating acute pancreatitis. **Br J Surg**, v. 80, p. 148-54, 1993.

WILLEY, B. M. et al. Detection of vancomycin resistance in Enterococcus species. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 1621-4, 1992.

WILLEY, B. M. et al. The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 15, p. 549-55, 1994.

WINSLET, M.; HALL, C.; LONDON, N. J. M. Relation of diagnostic serum amylase levels to aetiology and severity of acute pancreatitis. **Gut**, v. 33, p. 982-6, 1992.

WITT, H. et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. **Nat Genet**, v. 25, p. 213-6, 2000.

WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Host immune response to antibiotic perturbation of the microbiota. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 2, p. 100-3, 2010.

YAMASAKI, M. et al. Pancreatic and bile duct obstruction exacerbates rat caerulein-induced pancreatitis: a new experimental model of acute hemorrhagic pancreatitis. **J Gastroenterol**, v. 41, p. 352-60, 2006.

YUAN, Z. et al. Systemic inflammation with multiorgan dysfunction is the cause of death in murine ligation-induced acute pancreatitis. **J Gastrointest Surg**, v. 15, n. 10, p. 1670-8, oct., 2011.