

# **Pancreatite Aguda Novas Fronteiras no Prognóstico**

**Pedro Renato Sousa da Silva Vaz**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Medicina**  
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor José Guilherme Lopes Rodrigues Tralhão  
Coorientador: Professor Doutor Miguel Castelo-Branco Craveiro de Sousa  
Coorientadora: Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes

**outubro de 2020**  
(Versão definitiva, impressa no dia 14 de junho de 2021)



# Edital

As provas decorreram na Universidade da Beira Interior no dia 27 de maio de 2021 pelas 14:30 horas.

O júri foi constituído pelo Doutor Paulo Sérgio de Matos Figueira da Costa, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Doutor Rui Manuel Fraga Martins Maio, professor catedrático da NOVA Medical School da Universidade Nova de Lisboa, Doutor Lúcio José de Lara Santos, professor afiliado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos, professor associado da Universidade das Beira Interior e Doutora Ana Bela Sarmiento Antunes Cruz Ribeiro, professora associada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.



*A sabedoria é a razão intuitiva combinada com o conhecimento científico.*

**Aristóteles**



À Daniela, à Clarinha e ao Gabriel





Aos meus Mestres



# Agradecimentos

Esta tese representa o culminar de um projeto ao qual me propus. No entanto, para a sua concretização, muitos foram os que contribuíram de diversas formas e que me apoiaram. Por este motivo, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Diretor do Serviço de Cirurgia do Centro Hospital e Universitário de Coimbra, por ter aceitado este desafio e me ter permitido aprender muito do que hoje sei. Por me ter mostrado a possibilidade de desenvolver um trabalho que conjugasse a minha atividade clínica com a investigação e, fundamentalmente, me ter dado a possibilidade de realizar um trabalho de índole translacional, tendo sido o meu primeiro contacto com a investigação básica. A sua orientação, pautada por sábios e pertinentes conselhos, permitiu-me adquirir uma atitude crítica e desenvolver uma correta metodologia investigacional. Admiro a sua capacidade de trabalho, a sua entrega aos doentes, a sua dedicação profissional, associada a uma permanente atualização científica. Obrigado pelas críticas, sugestões e partilha de conhecimento. Obrigado, principalmente, pela amizade.

Ao Professor Doutor Miguel Castelo-Branco, Professor Catedrático da Universidade da Beira Interior e Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, por ter aceitado o desafio de coorientar este projeto. O seu conhecimento, profissionalismo, entusiasmo e curiosidade científica, aliados à sua experiência assistencial foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela disponibilidade constante, pelos ensinamentos, pela revisão cuidada dos documentos, pelas discussões pertinentes sobre os mais variados tópicos e pela amizade.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar com Agregação do *Institute for Clinical and Biomedical Research* da Universidade de Coimbra, por ter aceitado este desafio de coorientar este projeto e por me ter ensinado as diversas técnicas e metodologias, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela sua constante disponibilidade, orientação e paciência nos trabalhos de investigação básica. Obrigado pela revisão cuidada e crítica dos documentos. Obrigado pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança e apoio. Obrigado pelo seu exemplo de trabalho e dedicação. E, obrigado pela sua amizade!

Ao Dr. António Gouveia, Diretor do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, pelo incentivo, pelos ensinamentos

como meu orientador de formação, pelas oportunidades que me proporcionou e pelo apoio constante.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática e Diretora do *Institute for Clinical and Biomedical Research* da Universidade de Coimbra, por me ter recebido no seu grupo de investigação e me ter dado a oportunidade de desenvolver os meus trabalhos de investigação na prestigiada Unidade que dirige. Obrigado pela disponibilidade, pelas críticas, sugestões e partilhas de conhecimentos.

Ao Professor Doutor Luís Pedro Rato, atual Professor Adjunto Convidado na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda, pelo apoio prestado na realização dos trabalhos laboratoriais, enquanto investigador do Centro de Investigação das Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, aquando da realização deste trabalho, pela paciência, ensinamentos, apoio e preocupação constantes. Pelo seu exemplo de trabalho, dedicação e amizade.

Ao Professor Doutor Marco Alves, Investigador Auxiliar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, pela disponibilidade, paciência, revisão dos documentos e apoio na realização dos trabalhos da metabolómica e do stresse oxidativo e à Professora Doutora Ivana Jarak e ao Professor Doutor Pedro Oliveira, investigadores do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, pelo apoio na realização dos trabalhos de análise da metabolómica.

Ao Mestre Rui Caetano Oliveira, médico anatomopatologista do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, pelo apoio prestado na análise histológica e na avaliação crítica dos resultados. Um obrigado pela sua amizade.

À Professora Doutora Salomé Pires, Professora Auxiliar do *Institute for Clinical and Biomedical Research* da Universidade de Coimbra pelo apoio prestado na realização dos trabalhos de investigação básica e no apoio ao tratamento estatístico dos dados.

Ao Doutor Matafome, investigador do *Institute for Clinical and Biomedical Research* da Universidade de Coimbra e à Doutora Inês Baleiras, investigadora do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, pelo apoio prestado na realização deste trabalho de investigação.

À Professora Doutora Sara Nunes, Professora Adjunta do Instituto Politécnico de Castelo Branco, pelo apoio incondicional prestado na análise estatística. Pela sua disponibilidade, pelas críticas e motivação.

À Dra. Isabelle Salavessa, Assistente Convidada do Instituto Politécnico de Castelo Branco, pelo apoio dispensado na redação e correção do inglês.

À Bacharel Maria João, Técnica Responsável pelo Bem-Estar Animal do Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, pela constante disponibilidade e apoio nos trabalhos realizados no Centro de Investigação das Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

À Dra. Mariana Martins, Diretora do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, pela sua disponibilidade e entusiasmo como me apoiou na realização dos trabalhos de investigação clínica. Um obrigado especial aos TSDT - Área de Análises Clínicas do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco.

À Dra. Aida Paulino, médica cirurgiã do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, minha colega e amiga, que me ouviu e apoiou nos momentos de desânimo e com quem partilhei os momentos de ânimo. Um obrigado especial à sua amizade e presença.

Ao Dr. Eduardo Pereira, médico gastrenterologista do Serviço de Gastrenterologia do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, pela sua disponibilidade e motivação.

Aos elementos do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, pelo constante incentivo à concretização deste projeto e apoio dado na colheita dos dados. Um especial agradecimento ao Dr. Horácio Pérez e ao Dr. Rui Rainho, elementos da minha equipa.

Aos enfermeiros do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, pela compreensão e apoio na realização deste projeto.

Aos doentes, este trabalho é para eles!

O meu reconhecimento a todos os Amigos que, mesmo sem serem aqui especificamente referidos, me apoiaram e incentivaram tendo, individualmente, contribuído para a realização deste estudo.

À Daniela, dedico-lhe estes anos de vida por saber que, sem ela, nada disto era possível e com certeza que pequeno é o meu reconhecimento quando avalio o que me deu e o que perdeu ou não usufruiu. Tenho o resto da vida para te compensar. Fá-lo-ei!

E à família, que também viveu, embora à distância, as alegrias e desilusões, e souberam sempre compreender e aceitar o que ficou para além destas páginas.

Muito obrigado a todos.



# Prefácio

O presente estudo é um contributo para o conhecimento da fisiopatologia da pancreatite aguda e otimização do seu prognóstico. Nele se abordam aspetos do stress oxidativo e da metabolómica, no sentido de identificar eventuais biomarcadores e vias metabólicas presentes neste quadro clínico, e que, através da sua melhor compreensão poderão contribuir para a melhoria do prognóstico e para a identificação de novas terapias alvo.

Trata-se, neste sentido, de uma tese de doutoramento com carácter inovador em Portugal, quer pelo estudo de âmbito translacional, quer pelos objetivos traçados e pelos resultados obtidos, efetuada por um investigador clínico consignado à área da Cirurgia Geral.

A motivação para a prossecução deste trabalho residiu, por um lado, na circunstância da pancreatite aguda ser uma patologia complexa e com uma fisiopatologia ainda não totalmente compreendida e, por outro lado, de se tratar de uma das complicações da litíase vesicular, tão frequente em Portugal. Neste contexto, entendeu-se que urgia contribuir para a melhor compreensão do processo fisiopatológico, através do estudo do stress oxidativo e na identificação de vias metabólicas, com o recurso à metabolómica, uma área promissora na investigação da inflamação.

Esta tese, onde se encontra compilado todo o trabalho básico, designado como estudo pré-clínico e o estudo clínico, realizado no âmbito deste ambicioso projeto, está estruturada em seis capítulos principais.

O **primeiro capítulo** inclui uma visão sobre a anatomia e fisiologia do pâncreas e uma revisão do estado de arte sobre a pancreatite aguda, nomeadamente da epidemiologia, etiologia, fisiopatologia, diagnóstico e prognóstico.

No **segundo capítulo** encontram-se os principais objetivos estabelecidos para o desenvolvimento deste trabalho translacional.

No **terceiro capítulo** são enumerados, por estudo, os modelos *in vivo* e as características da população de doentes estudadas, bem como as diversas metodologias utilizadas.

No **quarto capítulo** são descritos todos os resultados do estudo pré-clínico e do estudo clínico obtidos durante a realização deste projeto.

No **quinto capítulo** desenvolve-se uma discussão dos resultados obtidos relativamente ao estudo pré-clínico e ao estudo clínico.

Por último, no **sexto capítulo**, são apresentadas as principais conclusões, bem como as perspetivas futuras inerentes.



# Resumo

A pancreatite aguda é um processo inflamatório do pâncreas com variável envolvimento dos tecidos pancreático, peripancreáticos e órgãos à distância. Em 80% dos casos a pancreatite aguda é leve, com edema intersticial e com recuperação, geralmente dentro da primeira semana. A pancreatite necrotizante, que pode ocorrer entre 15 a 20% dos doentes, é caracterizada por necrose, envolvendo o pâncreas e os tecidos peripancreáticos. Quando complicada por infecção está associada a uma alta morbimortalidade e a elevados encargos económicos.

Foi demonstrado, em vários estudos, o papel do stresse oxidativo na fisiopatologia da pancreatite aguda, particularmente na patogénese e na progressão deste processo inflamatório. No entanto, não está claro se as espécies reativas de oxigénio atuam como mediadores ou se iniciam a complexa cascata de eventos que leva à pancreatite aguda. O papel exato do stresse oxidativo no desenvolvimento desta condição patológica permanece assim por esclarecer.

A identificação precoce de doentes que irão desenvolver pancreatite aguda grave é de extrema importância, uma vez que vai permitir uma monitorização mais apertada, uma terapia de suporte individualizada e a prevenção das complicações associadas.

O objetivo desta dissertação foi aprofundar o conhecimento da fisiopatologia da pancreatite aguda no contexto de doentes com etiologia litiásica, nomeadamente na sua patogénese e na progressão do processo inflamatório, através da avaliação do stresse oxidativo e na identificação de novos biomarcadores de prognóstico, recorrendo-se ao estudo do perfil metabólico. Neste sentido, foi realizado um estudo em modelo animal e um estudo clínico numa amostra de doentes, de modo a identificar possíveis biomarcadores de prognóstico da pancreatite aguda de etiologia litiásica.

O estudo experimental realizado no rato, como modelo animal, consistiu na indução da pancreatite aguda em modelos cirúrgicos, que mimetizam a etiologia litiásica e num modelo não cirúrgico, modelo da hiperestimulação com análogo da colecistoquinina, a ceruleína. Foi proposto um *score* de gravidade da pancreatite aguda com recurso a parâmetros histológicos: edema, necrose, infiltrado inflamatório, hemorragia e vacuolização e que permitiu a classificação da pancreatite aguda em ausente, ligeira, moderada e grave. Quando se correlacionou este *score* com a procalcitonina, verificou-se uma correlação muito forte, indicando que a gravidade do *score* reflete o processo inflamatório pancreático. Verificou-se que o stresse oxidativo assumiu um papel na fase precoce do processo inflamatório pancreático, com a elevação dos níveis das espécies

reativas de oxigénio, uma diminuição das defesas antioxidantes e disfunção mitocondrial nos animais com pancreatite aguda e nas suas formas mais graves.

No estudo clínico constatou-se que, na amostra constituída por doentes com pancreatite aguda litiásica, na admissão, o azoto ureico, os neutrófilos e os leucócitos foram os melhores marcadores de gravidade, às 48 horas, a hepcidina, a razão neutrófilos/linfócitos e o índice de resposta inflamatória sistémica foram os melhores biomarcadores de prognóstico. Quando se avaliou o stresse oxidativo, na admissão dos doentes, observou-se uma elevação dos níveis das espécies reativas de oxigénio, uma diminuição das defesas antioxidantes e disfunção mitocondrial, principalmente naqueles com pancreatite aguda grave. Estes achados evidenciam o papel do stresse oxidativo como mediador, desde a fase inicial da pancreatite aguda litiásica, e como eventual marcador de prognóstico. Foi, também na admissão dos doentes, estudado o perfil metabólico que permitiu identificar, como eventuais biomarcadores de prognóstico da pancreatite aguda litiásica grave, a treonina, a fenilalanina e os lípidos.

Este estudo translacional permitiu identificar novos biomarcadores de prognóstico e contribuir para uma melhor compreensão do processo fisiopatológico da pancreatite aguda litiásica.

## **Palavras-chave**

PancreatiteAguda;Litiásica;Prognóstico;Fisiopatologia;StresseOxidativo;Metabólica

# Abstract

Acute pancreatitis is an inflammatory process of the pancreas with variable involvement of the pancreatic, peripancreatic tissues and distant organs. In 80% of cases, acute pancreatitis is mild, with interstitial oedema and recovery, usually within the first week. Necrotising pancreatitis, which may occur in 15-20% of patients, is characterised by necrosis involving the pancreas and peripancreatic tissues. When complicated by infection, it is associated with high morbidity and mortality and a high economic burden.

The role of oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis has been demonstrated in several studies, particularly in the pathogenesis and progression of this inflammatory process. However, it is unclear whether reactive oxygen species act as mediators or initiate the complex cascade of events leading to acute pancreatitis. The exact role of oxidative stress in the development of this pathological condition thus remains unclear.

Early identification of patients who will develop severe acute pancreatitis is of utmost importance, as it will allow closer monitoring, individualised supportive therapy and the prevention of associated complications.

This dissertation aims to deepen the knowledge of the pathophysiology of acute pancreatitis in patients with biliary etiology, particularly in its pathogenesis and in the progression of the inflammatory process, through the assessment of oxidative stress and in the identification of new prognostic biomarkers, using the study of the metabolomic profile. In this sense, a study in an animal model and a clinical study in a sample of patients was performed to identify possible prognostic biomarkers of biliary acute pancreatitis.

The experimental in the rat, as an animal model, consisted in induction of acute pancreatitis in surgical models, mimicking the lithiasis aetiology and in a non-surgical model, hyperstimulation model with cholecystokinin analogue, cerulein. A score of severity of acute pancreatitis was proposed using histological parameters: oedema, necrosis, inflammatory infiltrate, haemorrhage and vacuolization, which allowed the classification of acute pancreatitis into absent, mild, moderate and severe. When this score was correlated with procalcitonin, a very strong correlation was found, indicating that the severity of the score reflects the pancreatic inflammatory process. Oxidative stress was found to play a role in the early stage of the pancreatic inflammatory process, with increased levels of reactive species, decreased antioxidant defences and mitochondrial dysfunction in animals with acute pancreatitis and in its more severe forms.

In the clinical study, we found that in the sample of patients with biliary acute pancreatitis, on admission, blood urea nitrogen, neutrophils and leucocytes were the best markers of severity. At 48 hours hepcidin, neutrophil-lymphocyte ratio and systemic inflammatory response index were the best biomarkers of prognosis. When oxidative stress was assessed at patient admission, an elevation in reactive oxygen species levels, decreased antioxidant defences, and mitochondrial dysfunction was observed, mainly in those with severe acute pancreatitis. These findings highlight the role of oxidative stress as a mediator, from the initial phase of biliary acute pancreatitis and as a possible prognostic marker. The metabolomic profile of patients was also studied at admission, allowing the identification of threonine, phenylalanine and lipids as possible prognostic biomarkers of severe biliary acute pancreatitis.

This translational study allowed us to identify new prognostic biomarkers and better understand the pathophysiological process of biliary acute pancreatitis.

## **Keywords**

AcutePancreatitis;Biliary;Prognosis;Pathophysiology;OxidativeStress;Metabolomics

# Índice

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xxiii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xxvii</b>
<b>Lista de acrónimos, abreviaturas e fórmulas químicas</b>	<b>xxvix</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Pâncreas</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Pancreatite Aguda</b>	<b>5</b>
1.2.1. Diagnóstico	13
1.2.2. Prognóstico	14
<b>2. Objetivos gerais</b>	<b>23</b>
<b>3. Material e métodos</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Estudo Pré-Clínico</b>	<b>25</b>
3.1.1. Modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum	26
3.1.2. Modelo da laqueação duodenal em ansa fechada	27
3.1.3. Modelo da hiperestimulação com análogo da colecistoquinina	27
3.1.4. Avaliação serológica	28
3.1.5. Avaliação histológica do tecido pancreático	28
3.1.6. Avaliação da lesão oxidativa	29
3.1.6.1. Peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica	30
3.1.6.2. Defesas antioxidantes	31
3.1.7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	33
3.1.8. Análise estatística	33
<b>3.2. Estudo Clínico</b>	<b>34</b>
3.2.1. Caracterização demográfica e clínica	34
3.2.1.1. Recolha das amostras	35
3.2.2. Avaliação dos marcadores serológicos e <i>scores</i> multifatoriais de gravidade	36
3.2.3. Avaliação da lesão oxidativa e do potencial de membrana mitocondrial	37
3.2.4. Análise estatística	37
3.2.5. Avaliação do perfil metabólico por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton	37
<b>4. Resultados</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Estudo Pré-Clínico</b>	<b>39</b>
4.1.1. Avaliação serológica	39
4.1.2. Avaliação histológica do tecido pancreático	40
4.1.3. Avaliação da lesão oxidativa	45
4.1.3.1. Peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica	45

4.1.3.2. Defesas antioxidantes	48
4.1.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	53
<b>4.2. Estudo Clínico</b>	<b>56</b>
4.2.1. Caracterização demográfica e clínica	56
4.2.2. Avaliação dos marcadores serológicos e <i>scores</i> multifatoriais de gravidade	56
4.2.3. Avaliação da lesão oxidativa e do potencial de membrana mitocondrial na gravidade da PA	76
4.2.3.1. Peroxidação lipídica, nitração e carbonilação das proteínas	76
4.2.3.2. Defesas antioxidantes	78
4.2.3.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	81
4.2.4. Avaliação do perfil metabonómico em doentes com PA	82
<b>5. Discussão</b>	<b>91</b>
<b>5.1. Estudo Pré-Clínico</b>	<b>91</b>
<b>5.2. Estudo Clínico</b>	<b>97</b>
<b>6. Conclusão e perspectivas futuras</b>	<b>109</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>111</b>
<b>Lista de publicações</b>	<b>135</b>
<b>Anexos</b>	<b>141</b>
Anexo I.	141
Anexo II.	143
Anexo III.	144
<b>Artigos</b>	<b>147</b>
Artigo I.	147
Artigo II.	166
Artigo III.	192

# Lista de Figuras

- Figura 1.1** - Representação esquemática da fisiopatologia da pancreatite aguda (página 9)
- Figura 3.1** - Anatomia do pâncreas do rato (página 26)
- Figura 3.2** - Representação esquemática da técnica de indução da pancreatite aguda através da laqueação do ducto biliopancreático comum (página 26)
- Figura 3.3** - Representação esquemática da técnica de indução da pancreatite aguda através da laqueação duodenal em ansa fechada (página 27)
- Figura 3.4** - Fluxograma dos critérios de seleção dos doentes internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB com pancreatite aguda de etiologia litiásica e incluídos no estudo (página 35)
- Figura 4.1** - Avaliação dos níveis de procalcitonina nos modelos murinos de pancreatite aguda e grupos controlo (página 40)
- Figura 4.2** - Avaliação histológica de tecido pancreático de modelos murinos de pancreatite aguda (página 41)
- Figura 4.3** - Avaliação da procalcitonina no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 44)
- Figura 4.4** - Diagrama de dispersão do *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda com os níveis de procalcitonina (página 44)
- Figura 4.5** - Avaliação dos níveis das espécies reativas de oxigénio nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 46)
- Figura 4.6** - Avaliação dos níveis das espécies reativas de oxigénio no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 47)
- Figura 4.7** - Avaliação dos níveis das defesas antioxidantes nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 50)
- Figura 4.8** - Avaliação dos níveis das defesas antioxidantes no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 52)
- Figura 4.9** - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 54)
- Figura 4.10** - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 55)
- Figura 4.11** - Avaliação dos níveis dos marcadores serológicos nos doentes com pancreatite aguda litiásica e a sua relação com a RAC na admissão (página 60)

- Figura 4.12** - Avaliação dos níveis dos marcadores serológicos nos doentes com pancreatite aguda litiásica e a sua relação com a RAC às 48 horas após o início dos sintomas (página 63)
- Figura 4.13** - Comparação das AUC através da curva ROC dos marcadores serológicos, na admissão, na avaliação da gravidade e mortalidade da pancreatite aguda litiásica (página 66)
- Figura 4.14** - Comparação das AUC através da curva ROC dos marcadores serológicos, às 48 horas após o início dos sintomas, na avaliação da gravidade e mortalidade da pancreatite aguda litiásica (página 67)
- Figura 4.15** - Distribuição da totalidade dos doentes com pancreatite aguda (casos), dos doentes com pancreatite aguda grave (PA grave) e dos casos de mortalidade pelo *score* BISAP avaliados na admissão e às 48 horas após o início dos sintomas (página 68)
- Figura 4.16** - Distribuição da totalidade dos doentes com pancreatite aguda (casos), dos doentes com pancreatite aguda grave (PA grave) e dos casos de mortalidade pelo *score* SIRS avaliados na admissão e às 48 horas após o início dos sintomas (página 69)
- Figura 4.17** - Distribuição da totalidade dos doentes com pancreatite aguda (casos), dos doentes com pancreatite aguda grave (PA grave) e dos casos de mortalidade pelo MMS avaliados na admissão e às 48 horas após o início dos sintomas (página 69)
- Figura 4.18** - Comparação das AUC através da curva ROC dos *scores* multifatoriais, na admissão, na avaliação da gravidade e mortalidade na pancreatite aguda litiásica (página 70)
- Figura 4.19** - Comparação das AUC através da curva ROC dos *scores* multifatoriais, às 48 horas após o início dos sintomas, na avaliação da gravidade e mortalidade na pancreatite aguda litiásica (página 71)
- Figura 4.20** - Avaliação dos níveis das espécies reativas de oxigénio no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litiásica (página 77)
- Figura 4.21** - Avaliação dos níveis das defesas antioxidantes no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litiásica (página 80)
- Figura 4.22** - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litiásica (página 82)
- Figura 4.23** - Exemplo de um espetro obtido com a sequência típica de ressonância magnética nuclear de protão cpmg para o plasma entre o grupo controlo e os doentes com pancreatite aguda grave na admissão (página 83)



**Figura 4.24** - Gráficos de pontuação obtidos por modelos de análise de componentes principais e de análise de discriminantes – mínimos quadrados parciais de ressonância magnética nuclear de próton obtidos com a sequência cpmg de plasma entre o grupo controle e doentes com os três graus de gravidade da pancreatite aguda litiásica (página 84)

**Figura 4.25** - *Heatmap* representando as principais alterações do metaboloma plasmático associadas à gravidade da pancreatite aguda litiásica quando comparadas com o grupo controle (página 84)

**Figura 4.26** - Avaliação dos níveis de metabolitos no plasma entre o grupo controle e os doentes com pancreatite aguda litiásica (página 86)

**Figura 4.27** - Avaliação dos níveis de metabolitos no plasma de doentes com pancreatite aguda litiásica (página 88)

**Figura 5.1** - Síntese da hepcidina no processo inflamatório (página 102)



# Lista de Tabelas

- Tabela 1.1** - Etiologias da pancreatite aguda (página 6)
- Tabela 1.2** - Critérios de diagnóstico da pancreatite aguda (página 13)
- Tabela 1.3** - Relevância clínica dos *scores* multifatoriais na gravidade da pancreatite aguda (página 16)
- Tabela 1.4** - Relevância clínica dos marcadores serológicos na gravidade da pancreatite aguda (página 20)
- Tabela 3.1** - Caracterização dos parâmetros histológicos de tecido de pâncreas de modelos murinos de pancreatite aguda (página 29)
- Tabela 3.2** - *Score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 29)
- Tabela 4.1** - Avaliação dos níveis de amilase e lipase nos modelos murinos de pancreatite aguda e grupos controlo (página 39)
- Tabela 4.2** - Avaliação dos parâmetros histológicos incluídos no *score* histológico proposto dos modelos murinos de pancreatite aguda e grupo controlo (página 43)
- Tabela 4.3** - Avaliação dos níveis de amilase, lipase e procalcitonina de acordo com o *score* histológico nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 43)
- Tabela 4.4** - Distribuição dos níveis das defesas antioxidantes no grupo controlo e nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 48)
- Tabela 4.5** - Distribuição dos níveis das defesas antioxidantes no *score* de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 51)
- Tabela 4.6** - Distribuição do potencial de membrana no grupo controlo e nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 53)
- Tabela 4.7** - Distribuição do potencial de membrana no *score* de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda (página 54)
- Tabela 4.8** - Dados sociodemográficos e clínicos dos doentes com pancreatite aguda litiásica internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB (página 57)
- Tabela 4.9** - Avaliação dos marcadores serológicos dos doentes com pancreatite aguda litiásica e a sua relação com a RAC na admissão e às 48 horas de início dos sintomas (página 58)
- Tabela 4.10** - Tempo de avaliação e AUC dos marcadores serológicos para a gravidade e mortalidade da pancreatite aguda litiásica (página 66)
- Tabela 4.11** - Tempo de avaliação e AUC dos *scores* multifatoriais para a gravidade e mortalidade da pancreatite aguda litiásica (página 70)

- Tabela 4.12** - Avaliação da sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade (95% IC) dos diferentes marcadores serológicos e *scores* multifatoriais para a gravidade dos doentes com pancreatite aguda litiásica (página 73)
- Tabela 4.13** - Avaliação da sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade (95% IC) dos diferentes marcadores serológicos e *scores* multifatoriais para a mortalidade dos doentes com pancreatite aguda litiásica (página 74)
- Tabela 4.14** - Dados sociodemográficos e clínicos dos doentes com pancreatite aguda litiásica internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB (página 76)
- Tabela 4.15** - Distribuição dos níveis das defesas antioxidantes nos doentes com pancreatite aguda litiásica e no grupo controlo (página 79)
- Tabela 4.16** - Distribuição do potencial de membrana nos doentes com pancreatite aguda litiásica e no grupo controlo (página 81)
- Tabela 4.17** - Dados sociodemográficos e clínicos dos doentes com pancreatite aguda litiásica internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB (página 82)
- Tabela 4.18** - Distribuição dos níveis plasmáticos dos diversos metabolitos identificados entre o grupo controlo e os doentes com pancreatite aguda litiásica (página 85)
- Tabela 4.19** - Distribuição dos níveis plasmáticos dos diversos metabolitos identificados nos doentes com pancreatite aguda litiásica (página 87)

# Lista de acrónimos, abreviaturas e fórmulas químicas

$\Delta\Psi_m$	Gradiente eletroquímico da membrana interna mitocôndria
3-NO	3-nitrotirosina
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APACHE	Do inglês, <i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
ARDS	Do inglês, <i>Acute Respiratory distress syndrome</i>
ARRIVE	Do Inglês, <i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Do inglês, <i>Area under the curve</i>
BSA	Do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>
BISAP	Do inglês, <i>Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis</i>
BUN	Do inglês, <i>Blood urea nitrogen</i>
Ca <sup>2+</sup>	Ião cálcio
CASP	Caspase
CAT	Catalase
CCK	Colecistoquinina
CFTR	Do inglês, <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cl <sup>-</sup>	Ião cloreto
CPRE	Colangiopancreatografia retrógrada percutânea
CTSI	Do inglês, <i>Computed Tomography Severity Index</i>
DGAV	Direção Geral da Alimentação e Veterinária
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNP	Do inglês, Dinitrofenil
DNPH	2,4-Dinitrofenil-hidrazina
DNTB	2-nitrobenzoico (5,5'-dithiobis)
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EEC	Do inglês, <i>European Economic Community</i>
ES	Efeitos biológicos relevantes
Esp	Especificidade
EU	Do inglês, <i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUS	Do inglês, <i>Endoscopic ultrasonography</i>
FELASA	Do inglês, <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS-MS	Do inglês, <i>gas-chromatography/mass spectrometry</i>
GSH	Glutaciona na forma reduzida
GSSG	Do inglês, <i>Glutathione disulfide</i>
GSTM1	Do inglês, <i>Glutathione S-transferase M 1</i>
GSTP1	Do inglês, <i>Glutathione S-transferase Pi 1</i>

<b>GSTT1</b>	Do inglês, <i>Glutathione S-transferase Theta 1</i>
<b>H<sup>+</sup></b>	Ião hidrogénio
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HAL</b>	Hospital Amato Lusitano
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonato
<b>HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>HPLC</b>	Do inglês, <i>High performance liquid chromatography</i>
<b>HRP</b>	Do inglês, Horseradish peroxidase
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>JC1</b>	5.5',6.6'-tetracoloro-1.1',3.3'-tetraetilbenzimidazolilcarnocianina
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>LAMS</b>	Do inglês, <i>Lumen-apposing metal stent</i>
<b>LDH</b>	Do inglês, <i>Lactate dehydrogenase</i>
<b>LTA</b>	Do inglês, <i>Lymphotoxin Alpha</i>
<b>MCTSI</b>	Do inglês, <i>Modified Computed Tomography Severity Index</i>
<b>MMS</b>	Do inglês, <i>modified Marshall score</i>
<b>MODS</b>	Do inglês, <i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>
<b>MPTP</b>	Do inglês, <i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ião sódio
<b>NADPH</b>	Do inglês, <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NF</b>	Do inglês, <i>nuclear factor</i>
<b>NLR</b>	Do inglês, <i>Neutrophil-lymphocyte ratio</i>
<b>NS</b>	Do inglês, <i>not significant</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigénio
<b>PA</b>	Pancreatite aguda
<b>PBS</b>	Do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCA</b>	Do inglês, <i>Principal componente analysis</i>
<b>PCR</b>	Proteína C-reativa
<b>PCT</b>	Procalcitonina
<b>PLR</b>	Do inglês, <i>Platelet-lymphocyte ratio</i>
<b>PLS-DA</b>	Do inglês, <i>Partial least squares discriminant analysis</i>
<b>PMM</b>	Potencial da membrana mitocondrial
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PRSS1</b>	Do inglês, <i>Serine protease 1 gene</i>
<b>PUFA</b>	Do inglês, <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
<b>PVDF</b>	Do inglês, <i>Polyvinylidene fluoride</i>
<b>Q2</b>	Potencial preditivo
<b>R2</b>	Varição observada
<b>RAC</b>	Do inglês, <i>Revised Atlanta Classification</i>
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RNS</b>	Do inglês, <i>Reactive nitrogen species</i>
<b>ROS</b>	Do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
<b>Sen</b>	Sensibilidade
<b>SIRI</b>	Do inglês, <i>Systemic Inflammatory Response Index</i>
<b>SIRS</b>	Do inglês, <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>

<b>SO</b>	Stresse oxidativo
<b>SOD</b>	Do inglês, <i>Superoxide dismutase</i>
<b><i>SPINK1</i></b>	Do inglês, <i>Serine Protease Inhibitor Kazal-type 1</i>
<b>TBS</b>	Do inglês, <i>Tris buffered saline</i>
<b>TBS-T</b>	Do inglês, <i>Tris buffered saline-Tween</i>
<b>TCC</b>	Tomografia computadorizada com contraste
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b><i>TNFRSF1B</i></b>	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor receptor superfamily member 1B</i>
<b><i>TP53</i></b>	Do inglês, <i>Tumor protein 53</i>
<b>U</b>	Unidade
<b>UBI</b>	Universidade da Beira Interior
<b>UCI</b>	Unidade de Cuidados Intensivos
<b>ULSCB</b>	Unidade Local de Saúde de Castelo Branco
<b>UPLC-HRMS</b>	Do inglês, <i>Ultra-performed liquid chromatography-high resolution mass spectrometry</i>
<b>US</b>	Do inglês, <i>ultrasound</i>
<b>VCAM1</b>	Do inglês, <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
<b>VIP</b>	Valores de projeção
<b>VPN</b>	Valor preditivo negativo
<b>VPP</b>	Valor preditivo positivo
<b><i>vs</i></b>	<i>versus</i>
<b>w</b>	Pesos variáveis
<b>WBC</b>	Do inglês, <i>white blood count</i>





# 1. Introdução

A pancreatite aguda (PA) foi descrita pela primeira vez em 1652 pelo holandês Nicolaes Tulp [1]. Em 1889 Reginald Fitz, no seu artigo intitulado “*Acute pancreatitis: a consideration of pancreatic haemorrhage, hemorrhagic, suppurative and gangrenous pancreatitis, and of disseminated fat-necrosis*”, descreveu pormenorizadamente os sintomas clínicos de doentes com achados patológicos de PA [2]. Em 1896 Hans Chiari, no estudo da fisiopatologia da PA, postulou o envolvimento das enzimas pancreáticas na patogénese da necrose pancreática, propondo a teoria da autodigestão baseada na premissa de que o pâncreas “*succumbs to its own digestive properties*” [3]. Durante o século XX, várias teorias e tendências foram adotadas relativamente ao tratamento da PA quer na vertente médica quer na vertente cirúrgica, com a descrição de várias abordagens [4,5]. Em 1927, a descoberta do teste da amilase sérica por Elman, foi uma enorme contribuição para o diagnóstico diferencial de PA [6]. Devido à grande variabilidade da evolução clínica e à elevada morbidade e mortalidade observada nos doentes com PA, John Ranson *et al.* [7], em 1974, propuseram uma pontuação de gravidade, conhecida como *score* de Ranson, com critérios objetivos, baseados em variáveis clínicas e bioquímicas avaliadas na admissão e às 48 horas. Este *score* tinha o objetivo de identificar, o mais precocemente possível, os doentes que poderiam desenvolver complicações locais e sistémicas associadas ao processo inflamatório pancreático. Desde então, vários sistemas de classificação do prognóstico da PA foram desenvolvidos. A classificação de Atlanta, proposta durante o simpósio internacional em Atlanta, em 1992, veio trazer novos avanços tanto na definição da PA e classificação das suas complicações, como nos resultados clínicos [8]. Em 2012, esta classificação foi revista, permitindo colmatar algumas indefinições iniciais e a inclusão de uma nova categoria de gravidade, a PA moderadamente grave, às duas já aceites, a PA ligeira e a grave [9].

Apesar do aumento exponencial do conhecimento da complexa anatomia e fisiologia do pâncreas e da patogénese da PA, ao longo dos mais de 350 anos após a primeira descrição por Tulp, muitas questões acerca desta patologia permanecem ainda por esclarecer.

## 1.1. Pâncreas

O pâncreas é uma glândula do sistema digestivo com forma alongada, medindo 15 a 20cm de comprimento, de consistência macia, assumindo a cor rosa-acinzentada, com um peso médio de 68g (variação de 45 a 120g) [10,11] e situando-se próximo ao plano

transpilórico. Na idade adulta, possui um volume médio de 70 a 80cm<sup>3</sup> com tendência a ser maior no gênero masculino. A partir da sexta década de vida, a glândula atrofia e o tecido exócrino é substituído por tecido adiposo [11]. O pâncreas pode ser dividido em quatro regiões: cabeça, colo, corpo e cauda, encontrando-se a cabeça do pâncreas rodeada pelo arco duodenal [12-14]. A superfície ventral do pâncreas é coberta pelo peritoneu parietal, relacionando-se com a raiz do mesocólon transverso. Os vasos que irrigam o pâncreas estão contidos na fásia de fusão de Treitz [11,12].

A drenagem ductal pancreática é constituída, na grande maioria dos casos, por um ducto principal, ou ducto de Wirsung e um ducto acessório, ou de Santorini. O ducto de Wirsung começa na cauda e segue através da glândula, recebendo ductos de menor calibre num padrão em “espinha de peixe” [15]. Quando alcança o colo pancreático, assume uma orientação inferior e posterior, relacionando-se com o ducto biliar comum. Estas duas estruturas perfuram obliquamente a parede posteromedial da porção descendente do duodeno. Geralmente o ducto pancreático e o ducto biliar comum unem-se para formar a ampola hepatopancreática, ou ampola de Vater. Esta ampola abre-se no duodeno através de um ducto curto e comum, no ápex da papila maior. O esfíncter do ducto pancreático rodeia a sua parte terminal. Ao redor da ampola de Vater existe um outro esfíncter, denominado hepatopancreático ou esfíncter de Oddi. Estes esfíncteres controlam o fluxo biliar e pancreático [11]. O ducto de Santorini, que drena a parte da cabeça do pâncreas, é variável, estando, geralmente, unido ao ducto de Wirsung. Em cerca de 9% da população, o ducto de Santorini é independente com uma abertura própria no duodeno, na papila menor [12].

A principal vascularização do pâncreas provém de vários ramos do tronco celíaco e da artéria mesentérica superior. A cabeça do pâncreas e o duodeno adjacente são irrigados por artérias provenientes do tronco celíaco: artéria pancreatoduodenal superior anterior e posterior e provenientes da artéria mesentérica superior: artéria pancreatoduodenal inferior anterior e posterior. O corpo e a cauda pancreáticos são irrigados por múltiplos ramos da artéria esplénica [11,12]. A veia porta e as veias mesentérica superior e esplénica são as principais estruturas vasculares responsáveis pela drenagem venosa do pâncreas. A cabeça e o colo do pâncreas são drenados para as veias pancreatoduodenais superior e inferior, enquanto que o corpo e a cauda para a veia esplénica [16]. A drenagem linfática do pâncreas é, por sua vez, difusa e generalizada. Os linfáticos do corpo e da cauda drenam para os gânglios distribuídos ao longo da artéria esplénica e no bordo inferior da glândula e daí para os gânglios linfáticos pré-aórticos entre o tronco celíaco e a artéria mesentérica superior. A cabeça e o colo drenam para os gânglios linfáticos das artérias pancreatoduodenais, mesentérica superior e hepáticas [12]. O pâncreas possui um rico

suprimento nervoso autónomo [17]. A inervação eferente visceral é realizada através dos nervos vagos e esplâncnicos, por meio dos plexos hepático e celíaco. As células acinares, responsáveis pela secreção exócrina, as células das ilhotas, responsáveis pela secreção endócrina e a vasculatura das ilhotas são inervadas por ambos os sistemas. O sistema parassimpático estimula a secreção endócrina e exócrina, sendo inibida pelo sistema simpático. O pâncreas também é inervado por neurónios que secretam aminas e péptidos, como a somatostatina e péptido intestinal vasoativo. Possui, também, fibras sensoriais aferentes, responsáveis pela dor intensa, associada a condições patológicas pancreáticas [11,12].

O pâncreas é um órgão constituído por glândulas exócrinas e endócrinas. O pâncreas exócrino é composto pelas células acinares, que constituem a unidade funcional pancreática exócrina e pelas células ductais. O ácino possui cerca de 20-200 células acinares, células centroacinares adjacentes que se projetam para o lúmen e pequenos ductos proximais [13,18]. A glândula exócrina, quando comparada com outros órgãos, apresenta uma elevada taxa de síntese proteica diária, correspondente a 1000-1500mL de suco pancreático, com 10-100g/L de proteína. Este processo é sequencial, iniciando-se com a síntese das proteínas no retículo endoplasmático, transporte vesicular para o complexo de Golgi, a sua incorporação nos grânulos de zimogénio e secreção por exocitose [18,19]. É controlado pela concentração de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) citosólico, que por sua vez responde à atividade da acetilcolina (ACh) ou da colecistoquinina (CCK), ambas localizadas na membrana basolateral da célula acinar [20]. Devido ao grande gasto energético associado à síntese proteica, as células acinares contêm um elevado número de mitocôndrias [21]. A principal função do pâncreas exócrino é fornecer a maioria das enzimas necessárias para a digestão alimentar. A taxa de produção do suco pancreático em repouso é de 0.2-0.3mL/min, aumentando para 4.0mL/min durante a estimulação pós-prandial [18]. As células acinares sintetizam proteases, como a tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase e elastase, sob a forma de proenzimas inativas, que digerem as proteínas dos alimentos. Estas proenzimas são excretadas para o ducto pancreático. A mucosa duodenal sintetiza a enterocinase, enzima fundamental para a ativação enzimática da tripsina a partir do tripsinogénio. A tripsina propaga a ativação das enzimas pancreáticas através da autoativação do tripsinogénio e de outras proenzimas, como quimotripsinogénio, procarboxipeptidase e proelastase [13]. Para além das proteases, as células acinares produzem a amilase e lipase. A amilase hidrolisa os principais polissacarídeos em pequenos oligossacarídeos e a lipase, por sua vez, hidrolisa as gorduras ingeridas, em ácidos gordos livres e 2-monoglicerídeos. As células acinares produzem também a colipase, colesterol éster hidrolase, fosfolipase A<sub>2</sub>, desoxirribonuclease e ribonuclease [13]. Estas células sintetizam o inibidor da tripsina

pancreática, para proteção das células acinares da autodigestão, neutralizando a ativação prematura do tripsinogênio no seu interior. O inibidor da tripsina secretora pancreática é codificado pelo gene Kazal tipo 1 (*SPINK 1*, do inglês, *Serine Protease Inhibitor Kazal-type 1*), inibidor da serina-protease [13]. A principal função das células ductais é fornecer a água e os eletrólitos necessários para diluir e distribuir as enzimas sintetizadas pelas células acinares. Embora as concentrações de sódio ( $\text{Na}^{2+}$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) sejam semelhantes à do plasma, no suco pancreático as concentrações de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) variam significativamente de acordo com a fase de secreção [18,22]. Quando o  $\text{HCO}_3^-$ , secretado pelas células ductais, atinge o lúmen duodenal, neutraliza o ácido clorídrico produzido pelas células parietais. As enzimas pancreáticas são inativadas em pH baixo, sendo o  $\text{HCO}_3^-$  pancreático responsável pelo pH ideal para a função da enzima celular acinar [13].

A secreção exócrina pancreática ocorre durante o estado interdigestivo e após a ingestão de alimentos, decorrendo em três fases. A primeira fase é a cefálica, na qual o pâncreas é estimulado pelo nervo vago em resposta à visão, cheiro ou sabor dos alimentos. Esta fase é geralmente mediada pela libertação da ACh nas terminações das fibras pós-ganglionares. O principal efeito da ACh é induzir a secreção das células acinares. Esta fase é responsável por 20 a 25% da secreção diária de suco pancreático. A segunda fase da secreção pancreática é conhecida como fase gástrica e é mediada por reflexos vagovagais, desencadeados pela distensão gástrica após a ingestão de alimentos. Estes reflexos induzem a secreção celular acinar, sendo responsável por 10% do suco pancreático produzido diariamente. A fase mais importante da secreção pancreática é a fase intestinal, responsável por 65 a 70% da secreção total. É mediada pela secretina e CCK. O ácido gástrico e a gordura semidigerida no lúmen duodenal induzem a libertação de secretina pelas células S, sendo o mediador mais importante da secreção de água,  $\text{HCO}_3^-$  e outros eletrólitos no duodeno. Os recetores de secretina estão localizados na membrana basolateral de todas as células ductais e são membros da superfamília dos recetores acoplados à proteína G. O efeito mais importante da estimulação da secretina é um aumento da adenosina monofosfato cíclico intracelular, que ativa a bomba  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  na membrana apical das células ductais. Também aumenta a atividade da enzima anidrase carbónica, a excreção de hidrogénio ( $\text{H}^+$ ) fora das células ductais e a atividade do regulador da condutância transmembranar da fibrose quística (*CFTR*, do inglês, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) [13,18]. A presença de lípidos, proteínas e carboidratos no lúmen duodenal induz a secreção do fator de libertação da CCK. Enquanto a secretina é o principal mediador da secreção de água e  $\text{HCO}_3^-$  na fase intestinal, a CCK é o principal mediador da secreção das enzimas pancreáticas [13,18,23].

## 1.2. Pancreatite Aguda

A PA é um processo inflamatório do pâncreas, com variável envolvimento dos tecidos pancreáticos, peripancreáticos e órgãos à distância [24,25]. Moynihan, em 1925, descreveu a PA como “a mais terrível das calamidades que poderia acontecer com uma víscera abdominal” [4,26]. É uma condição patológica gastrointestinal aguda comum em grande parte do mundo, incluindo Europa, Ásia e Estados Unidos da América (EUA) [27] e constitui uma importante causa de hospitalização, sendo responsável, nos EUA, por cerca de 220 000 a 320 000 admissões hospitalares por ano [28,29]. A incidência da PA varia entre regiões geográficas, principalmente devido às diferentes etiologias, nomeadamente a litíase e alcoólica, que são as mais frequentes. Na Europa, a sua incidência também varia, sendo mais elevada nas regiões leste e norte. É descrita, de uma forma global, em mais de 40 por 100 000 habitantes por ano [30]. As altas incidências são também reportadas ao Japão (49.4), EUA (43.8) e Tailândia (56.9) [30-35]. Em Portugal, e mais exatamente no Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco (HAL-ULSCB), estima-se que a incidência varie entre 80 a 90 por 100 000 habitantes por ano, não existindo publicada, a incidência nacional de PA. Nas últimas décadas, tem se verificado, globalmente, uma tendência para o aumento da incidência [30], devendo-se, em parte, à obesidade e à litíase [36]. Apesar do aumento da sua incidência, a mortalidade global permanece estável, entre os 10 a 15%, estando descrita em alguns estudos entre os 30 a 50% na PA grave [37-39].

A determinação do fator etiológico responsável pela PA é um componente essencial da avaliação diagnóstica [40], influenciando o plano terapêutico e permitindo a eliminação do fator precipitante e da recorrência, uma vez que diferentes etiologias associam-se a diferentes complicações. Os fatores etiológicos mais comuns são a litíase e o álcool, que são responsáveis por aproximadamente 75 a 80% de todos os casos de PA [41-43]. Milheiro *et al.* [44] mostraram no seu estudo, que em Portugal estes dois fatores etiológicos são os mais frequentes, contando a litíase com 59% e o álcool com 24% dos casos. Por sua vez, Silveira *et al.* [45] na análise dos fatores de prognóstico verificaram que 72.4% da amostra estudada era constituída por doentes com PA litíase. As outras causas menos frequentes incluem a hipertrigliceridemia, hereditária, hipercalcemia, trauma abdominal, realização de colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE), isquemia, obstrução do ducto pancreático por neoplasias, alterações anatómicas ou lesões ampulares e duodenais, infeções, autoimunes, exposição a uma variedade de fármacos ou venenos. A PA idiopática representa menos de 20% dos casos [40,43,46]. Na tabela 1.1 estão representadas as diversas etiologias da PA.

**Tabela 1.1** - Etiologias da pancreatite aguda.

Etiologia
Cálculos biliares
Álcool
Hiperlipidemia
Hereditária
Hipercalcemia
Trauma
Externo
Cirúrgico
CPRE
Isquemia
Hipoperfusão
Vasculite
Obstrução do ducto pancreático
Neoplasias
Pâncreas <i>divisum</i>
Lesões ampulares e duodenais
Infeção
Autoimune
Veneno
Drogas / Medicamentosa
Idiopática

CPRE: colangiopancreatografia retrógrada percutânea

É frequente a existência da associação de fatores de risco, em particular da litíase com o consumo abusivo de álcool. A etiologia pode variar consoante se trate de um episódio primário ou um quadro de recorrência. Neste contexto, a litíase está mais associada a episódios primários e o álcool a casos de recorrência [32,47,48]. A incidência da PA litiásica aumenta com a idade e tem maior predominância no género feminino. Já a PA alcoólica ocorre em indivíduos mais novos e mais comumente nos homens [43,49]. A etiologia alcoólica é dominante na maioria dos estudos da Europa oriental, enquanto no oeste e norte europeus a proporção é semelhante para ambas as etiologias. A litíase é a etiologia dominante no Mediterrâneo e noutros países do sul da Europa, com uma proporção para litíase:álcool, geralmente superior a 5:1 e, às vezes, superior a 10:1 [30].

Nas últimas décadas, a patogenia e a fisiopatologia da PA têm sido objeto de inúmeros estudos [50]. Apesar destes trabalhos, a total compreensão da sua complexa fisiopatologia continua por esclarecer [51]. Acredita-se que a exposição a um fator etiológico, como a litíase ou o álcool, desencadeie uma cascata de eventos patológicos, que resultam em alterações locais e sistémicas. No entanto, apenas uma pequena percentagem de indivíduos expostos a estes fatores etiológicos, irão manifestar clinicamente a doença [52]. Foram propostas várias teorias e mecanismos, nomeadamente a ativação intra-acinar e ductal das enzimas proteolíticas, a quimiotaxia dos leucócitos, a libertação de citocinas pró

e anti-inflamatórias, o stresse oxidativo (SO), a disfunção mitocondrial, a migração dos cálculos biliares, a lesão da microcirculação e a translocação bacteriana para o pâncreas e para a circulação sistêmica [53,54]. Estas teorias e mecanismos, no entanto, só permitem explicar alguns casos específicos da PA ou aspetos peculiares do processo que a desencadeia [53].

Considera-se que a PA ocorra em duas fases sobrepostas, com dois picos de mortalidade: a fase precoce e a tardia. A fase precoce, que geralmente dura a primeira semana, é seguida por uma segunda fase, a fase tardia, que pode desencadear uma evolução prolongada de semanas a meses [9]. Na primeira fase são ativadas as cascatas de citocinas pelo processo inflamatório, que se manifestam clinicamente pela síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). Quando a SIRS é mantida, existe um risco de desenvolvimento de falência multiorgânica. A fase tardia, por sua vez, é caracterizada pela persistência de sinais sistêmicos de infeção ou pela presença de complicações locais [55].

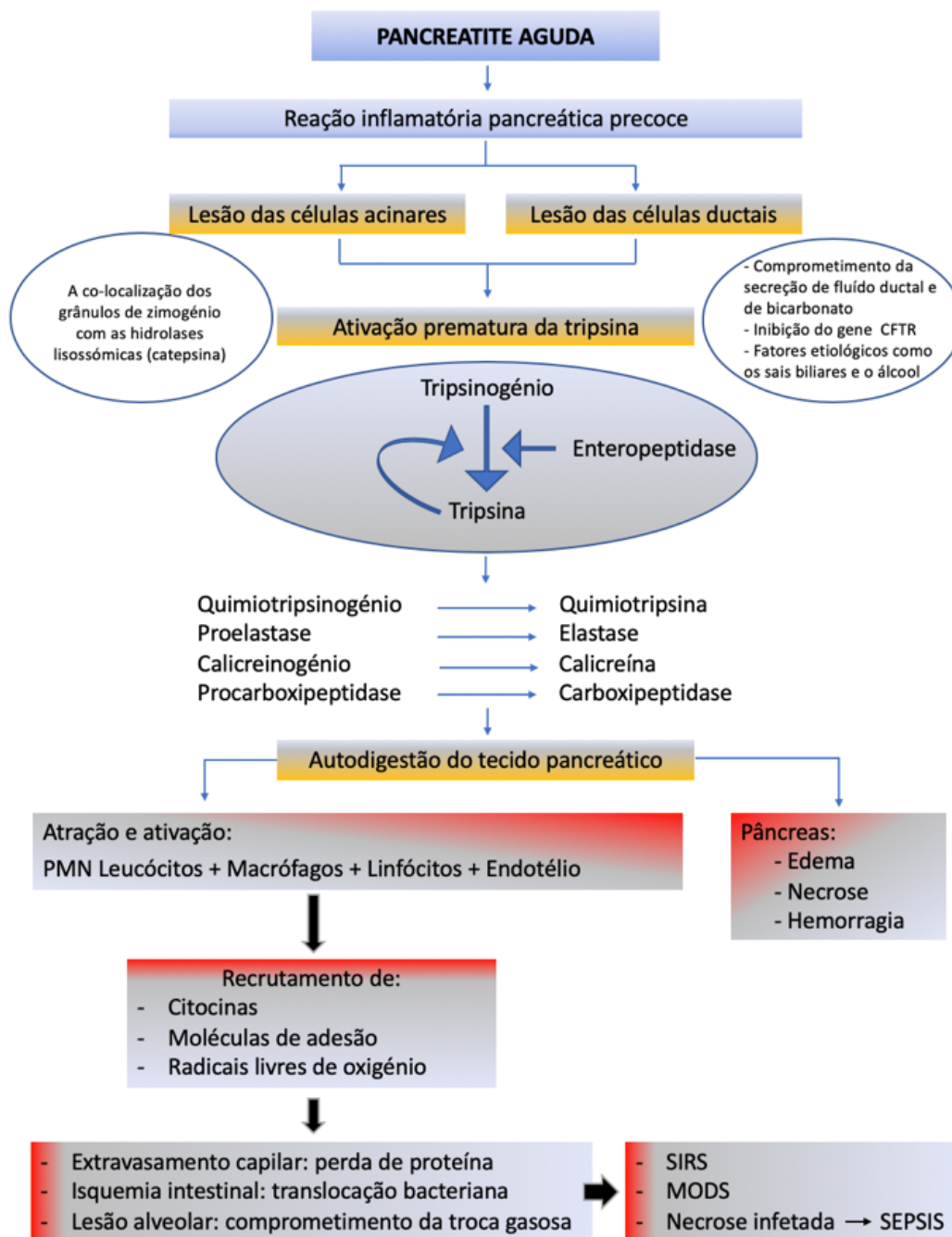
Numa tentativa de se compreender melhor a patogenia e a fisiopatologia da PA, um conjunto de mecanismos ou teorias têm sido propostos [52], tal como esquematizado na figura 1.1. Os eventos iniciais da PA têm lugar nas células acinares [56], que podem atuar como células inflamatórias, uma vez que também elas, respondem, sintetizam e libertam citocinas e moléculas de adesão [57]. Estudos recentes mostraram também, que as células ductais estão envolvidas nos eventos iniciais do desenvolvimento do processo inflamatório [58]. A principal função dos ductos pancreáticos é a secreção da maior parte do fluído pancreático, a absorção do  $\text{Cl}^-$  e a secreção do  $\text{HCO}_3^-$ , que pode ser influenciada pelo álcool, ácidos gordos e ácidos biliares [59-61]. As alterações da secreção de fluído ductal e de  $\text{HCO}_3^-$  estão relacionadas com a função e excreção da *CFTR* [58]. Por sua vez, o pâncreas exócrino sintetiza e segrega enzimas digestivas que são ativadas principalmente quando atingem o duodeno. É reconhecido um processo de proteção contra a ativação da tripsina dentro das células acinares, tendo sido implicados o *SPINK1*, a mesotripsina, a enzima Y, a  $\alpha 1$ -antitripsina, a  $\alpha 2$ -macroglobulina e a autólise da tripsina prematuramente ativada [62]. Como consequência, ocorre a autodigestão pancreática decorrente dos mecanismos de colocação das enzimas lisossômicas, incluindo a catepsina  $\beta$  e a ativação intra-acinar das enzimas proteolíticas em quantidades excessivas. A tripsina promove a ativação das vias do complemento, coagulação ou fibrinólise, estendendo o processo para fora do pâncreas. Paralelamente, ocorre disfunção da microcirculação pancreática com o aumento da permeabilidade microvascular [63], favorecendo o SO, a libertação de citocinas e as enzimas lipolíticas e proteolíticas, que induzem trombose, hemorragia e em último grau necrose. Podem também estar envolvidas outras substâncias, nomeadamente a substância P,

proteína cinase ativada pelo mitogénio, cinase regulada por sinal extravelular, P-seletina ou E-seletina e proteínas da ciclooxygenase-2 ou de choque térmico [64,65]. Estes eventos podem conduzir ao desenvolvimento da SIRS, mediada por citocinas que afetam órgãos à distância, nomeadamente o sistema respiratório, cardiovascular e renal. Finalmente, pode ocorrer a síndrome de disfunção multiorgânica (MODS, do inglês *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*), associada à infeção do tecido necrótico pancreático, relacionada com a translocação bacteriana [66]. Neste processo patológico a variabilidade genética individual está também implicada, podendo explicar as diferentes suscetibilidades para o desenvolvimento da doença em diferentes indivíduos. Os genes identificados incluem o gene do tripsinogénio catiónico (*PRSS1*, do inglês *Serine Protease 1 gene*) e o *CFTR*, além das variações genéticas no *SPINK1* [67,68].

A compreensão dos processos que decorrem na fase precoce da PA nas células acinares e ductais, bem como o conhecimento do papel das citocinas, do SO, da função mitocondrial e da translocação bacteriana é fundamental para a melhoria diagnóstica, uma mais apurada classificação do prognóstico e para um estabelecimento de um plano terapêutico individualizado eficaz.

Na fase precoce da PA ocorre, na célula acinar, a ativação inadequada das enzimas pancreáticas que provoca a autodigestão e a lesão celular [4]. Estudos envolvendo o perfil proteómico demonstraram que a ativação das proteases digestivas é o elemento-chave e precoce na patogénese da PA [55]. A teoria da colocalização dos grânulos de zimogénio com hidrolases lisossómicas, como a catepsina  $\beta$ , resulta na ativação da tripsina com a consequente ativação das vias de morte celular [54,69]. O tripsinogénio é o mais importante zimogénio na iniciação da lesão pancreática [70]. Estudos *in vivo*, demonstraram que a expressão intra-acinar de tripsina ativada, foi suficiente para induzir o processo inflamatório e a morte celular [71]. A ativação do fator nuclear (NF, do inglês *Nuclear Factor*)- $\kappa$ B, um processo paralelo à ativação do tripsinogénio, tem também sido associado à PA [72]. O evento responsável pela colocalização das frações lisossómicas e zimogénicas em organelos parece ser autofágico, uma vez que se verifica uma indução prematura da resposta autofágica [54] e ocorre em ambientes de pH baixo, sendo a acidemia um fator precipitante [73]. Foi verificado, em modelos animais, que o mecanismo de proteção, constituído pelos inibidores da catepsina  $\beta$ , impede este processo, com a consequente diminuição da gravidade da inflamação [74]. O processo de autodigestão é também inibido pelo armazenamento de proteases sob a forma de precursores, pela síntese de inibidores de proteases, como o inibidor da tripsina pancreática e *SPINK1* e pela baixa concentração de  $Ca^{2+}$  nos grânulos de zimogénio.





**Figura 1.1** – Representação esquemática da fisiopatologia da pancreatite aguda. A ativação prematura da tripsina causada pela lesão das células acinares e ductais e a atração e ativação dos leucócitos, macrófagos, linfócitos e endotélio causa a libertação de citocinas, moléculas de adesão e radicais livres de oxigénio. Estes eventos são responsáveis pelo extravasamento capilar de proteínas, isquemia intestinal, translocação bacteriana e alterações ao nível alveolar. A SIRS é resultado de todos esses eventos, podendo evoluir para a disfunção multiorgânica, bem como infeção da necrose pancreática e sepsis. *CFTR*: *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*; PMN: polimorfonuclear; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*; MODS: *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*. Publicado em Silva-Vaz *et al.* 2020 [75].

Estudos recentes têm demonstrado que o ducto pancreático está, conjuntamente com as células acinares, envolvido no processo fisiopatológico da PA. A principal função do

ducto pancreático é a secreção da maior parte do fluido ductal e de  $\text{HCO}_3^-$ . O fluido ductal ou pancreático, constituído por água, proteases, lipase e amilase, nucleotidasas e grande quantidade de  $\text{HCO}_3^-$ , é necessário para a excreção das enzimas digestivas do pâncreas. Por sua vez, as funções do  $\text{HCO}_3^-$  são a neutralização do ácido gástrico no duodeno e a prevenção da ativação prematura das enzimas digestivas. Igualmente importante, o seu efeito caotrópico facilita a solubilização de íons bivalentes e de macromoléculas no fluido pancreático, incluindo as enzimas digestivas e mucina [60,76]. A importância da secreção do fluido ductal é evidente na inibição deste processo [60]. Foi demonstrado que, mesmo uma pequena redução de fluido ductal e da secreção de  $\text{HCO}_3^-$  é suficiente para aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de PA, sugerindo que uma alteração da função das células ductais precede a disfunção da célula acinar [77]. A associação dos ácidos biliares com a PA é longa e algo controversa. Opie *et al.* [78], há mais de cem anos, sugeriram que o refluxo dos ácidos biliares no pâncreas, através do ducto biliopancreático comum, causado pela impactação de cálculos biliares na ampola de Vater, é um importante mecanismo fisiopatológico da PA. No entanto, ao longo dos anos, vários estudos questionaram o papel do refluxo dos ácidos biliares na PA, sendo que a principal objeção, um vez formado o ducto comum, é a insuficiência do gradiente de pressão entre os ductos biliar e pancreático para causar refluxo de bÍlis no pâncreas [79]. Achados recentes voltaram a questionar o papel dos ácidos biliares na fisiopatologia da PA, uma vez que se verificou uma grande sensibilidade das células pancreáticas à presença desses ácidos [80]. Uma alteração da conjugação dos ácidos biliares está relacionada com o risco de PA, uma vez que pode provocar a formação de cálculos biliares e a inibição da secreção de  $\text{HCO}_3^-$  [59]. A *CFTR* é expressa no ducto pancreático e a sua diminuição está associada ao desenvolvimento e gravidade da PA, devido ao comprometimento quer da secreção do fluido ductal, quer de  $\text{HCO}_3^-$  levando a uma diminuição do pH luminal, com conseqüente elevação da concentração pancreática das enzimas digestivas ativadas [58,81,82].

Durante a fase precoce da PA ocorre, também, a libertação de vários mediadores inflamatórios que causam uma reação em cascata, contribuindo para a falência multiorgânica e morte [5,83,84]. Na PA grave, a produção de um grande número de citocinas e substâncias vasoativas pode, direta ou indiretamente, originar uma diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo local, adesão leucocitária e aumento da permeabilidade capilar, condicionando alterações microcirculatórias pancreáticas. A libertação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1, -6 e -8, fator de ativação plaquetária e dos mediadores anti-inflamatórios, como os antagonistas dos recetores de IL-2, -10 e -11, assumem um papel na propagação do processo inflamatório. Como resultado, verifica-se um recrutamento de

TNF- $\alpha$ , IL-1 e -7, neutrófilos e macrófagos para o parênquima pancreático, causando a libertação de mais TNF- $\alpha$ , IL-1 e -6, espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), prostaglandinas, fator de ativação plaquetária, leucotrienos, óxido nítrico, várias enzimas proteolíticas e lipolíticas e moléculas de adesão endotelial, como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM, do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule*)-1.

Foi demonstrado que as ROS assumem um importante papel na fisiopatologia da PA [56,85,86]. Na fase precoce foi, também, clarificada a importância do SO na patogénese da PA [87-89]. No entanto, não está claro se as ROS atuam como mediadores ou se iniciam a complexa cascata que leva à PA [90]. Apesar dos inúmeros estudos publicados sobre o SO, o seu exato papel na patogénese do processo inflamatório pancreático permanece por esclarecer [91]. As ROS são sintetizadas em vários locais do organismo. As produzidas na célula acinar, podem alterar os padrões de morte celular, enquanto que as sintetizadas e libertadas pelos neutrófilos circulantes influenciam, não só a lesão local, mas também as complicações sistémicas. O processo de morte das células acinares ocorre por apoptose, autofagia ou necrose [92]. O mecanismo de lesão celular das ROS foi demonstrado através da rotura da membrana lipídica, das proteínas e do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic acid*). [93]. Os mecanismos associados às ROS são a peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica. As defesas antioxidantes incluem as enzimas glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Vários estudos *in vitro* analisaram o efeito das ROS nas células acinares pancreáticas [94], concluindo que a progressão da PA está associada à sua síntese intracelular, com uma ação maior nos grânulos de zimogénio do que nas membranas celulares. Nestas células, as ROS são responsáveis pela síntese de citocinas inflamatórias, através de um mecanismo mediado pela ativação de NF- $\kappa$ B. Foi também observado, que o SO promove a lise dos grânulos de zimogénio e inicia a vacuolização intracelular, resultando na ativação da tripsina [95]. As ROS apresentam propriedades de quimiotaxia que levam à SIRS, envolvendo a cascata do complemento, várias citocinas e outras moléculas de fase aguda [88,96]. A gravidade da PA está fortemente relacionada com as complicações sistémicas, e em particular com a síndrome de dificuldade respiratória do adulto (ARDS, do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*) que é a principal responsável pela mortalidade da fase precoce, uma vez que o SO está, também, envolvido na rápida progressão do processo inflamatório local para a falência multiorgânica, nomeadamente a lesão pulmonar [90]. Na fase precoce da PA pode também ocorrer hipotensão severa, secundária à desidratação grave, conduzindo a um quadro de choque, muitas vezes refratário, que se encontra associado a uma elevada mortalidade [97]. Este quadro é caracterizado por mecanismos de alteração da microcirculação do pâncreas e por isquemia pancreática, onde o SO também

assume um importante papel, uma vez que os fenômenos de isquemia/reperfusão e inflamação contribuem para a disfunção mitocondrial e aumento da produção de ROS [98]. O SO parece, também, estar envolvido na alteração da permeabilidade intestinal secundária à PA, tendo-se, em alguns estudos, verificado fuga de albumina sérica humana, radiomarcada do sangue para o estômago, intestino delgado e cólon [99,100]. O tecido adiposo é afetado também pelo SO, estando a necrose gorda, característica da PA grave, relacionada com a ação da lipase nos lipídios armazenados nos adipócitos e na infiltração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) ativados, que geram importantes quantidades de ROS. Em estudos experimentais foi observado o papel da peroxidação lipídica na resposta inflamatória e morte celular [90], na promoção da ativação das células endoteliais, a sua capacidade de recrutar células inflamatórias, e interferindo com as funções das proteínas associadas à membrana [101]. As ROS apresentam outras funções biológicas importantes, como a regulação de fatores de transcrição, das vias de transdução e na interação direta com várias moléculas [65]. No entanto, foi também atribuído um papel protetor das ROS sintetizadas na célula acinar, uma vez que, em condições de stresse potenciam a morte celular por via da apoptose, evitando a necrose. Estudos evidenciam que quando as ROS estão associadas à SIRS, sintetizadas principalmente pelos neutrófilos, são mais prejudiciais, podendo amplificar a cascata inflamatória e agravar a lesão tecidual [102]. Esta dualidade de resultados torna crucial o estudo do papel do SO na PA.

O pâncreas exócrino sintetiza e liberta grandes quantidades de proteína necessitando de altas concentrações de energia. A mitocôndria assume o papel fundamental na homeostasia celular e no metabolismo energético [68,103]. Estes organelos transformam a energia química libertada pela oxidação do substrato num gradiente eletroquímico ( $\Delta\Psi_m$ ), através da membrana interna. O potencial da membrana mitocondrial (PMM) pode então ser usado para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) e para o armazenamento de  $Ca^{2+}$ . Uma vez que, o ATP é necessário para praticamente todas as etapas dependentes de energia no metabolismo das células acinares pancreáticas, a disfunção mitocondrial tem sido implicada na lesão tecidual na PA [104]. O comprometimento da membrana mitocondrial externa permite a fuga de grandes proteínas do espaço entre as membranas interna e externa, incluindo citocromo C que, por sua vez, ativa as caspases no citosol e induz a apoptose [105]. A apoptose, uma forma bem organizada e regulada de morte celular, que não envolve a libertação descontrolada de proteases digestivas e citocinas ativas no espaço intersticial, geralmente é seguida pela regeneração tecidual. Os danos à membrana externa também conduzem ao colapso do  $\Delta\Psi_m$  e ao subsequente esgotamento de energia e necrose das células acinares [103,106-108]. A necrose atrai células inflamatórias, que vão influenciar a gravidade da PA [105,109]. A despolarização da membrana mitocondrial

interna, promovida pela estimulação fisiológica da CCK, conduz à abertura do complexo de poros de transição da permeabilidade mitocondrial (MPTP), com a conseqüente redução da síntese de ROS e prevenção da libertação de citocromo C. Quando ocorre a abertura sustentada do MPTP, permitindo a entrada não seletiva de moléculas até 1.5kDa, através da membrana interna para a matriz mitocondrial, verifica-se edema generalizado, o colapso do  $\Delta\Psi_m$  e, conseqüentemente, a necrose celular [110,111]. O equilíbrio entre a apoptose e a necrose determina a gravidade da PA [105]. A disfunção mitocondrial está associada a um estado de *deficit* energético na célula acinar, podendo provocar apoptose ou necrose [106]. Ocorrem, também, alterações da concentração de  $Ca^{2+}$  resultando em variações do PMM, devido ao aumento da permeabilidade desta membrana, permanecendo, por esclarecer, o mecanismo exato desta alteração [112].

Em 1986, foi demonstrada uma ligação entre a flora intestinal, a infeção por necrose pancreática e o resultado clínico em doentes com PA grave [113]. As alterações na motilidade, flora, na função da barreira mucosa intestinal e no sistema imunológico, foram identificadas como aspetos fundamentais da translocação bacteriana durante a PA [114]. O aumento da permeabilidade intestinal tem sido associado diretamente à falência multiorgânica e à gravidade da PA. Foi demonstrada, na PA, a translocação de *Escherichia coli* através do epitélio intestinal para os gânglios linfáticos mesentéricos, peritoneu e corrente sanguínea [115].

### 1.2.1. Diagnóstico

O diagnóstico de PA é estabelecido tendo em conta a revisão da classificação de Atlanta (RAC, do inglês *revised Atlanta classification*), publicada em 2013 [9]. Apesar dos vários estudos realizados, não está descrito nenhum teste específico para o diagnóstico de PA, requerendo este, uma combinação entre a história clínica, o exame objetivo, os estudos laboratoriais e/ou exames de imagem [116,117]. Na tabela 1.2 estão descritos os critérios de diagnóstico da PA, considerando-se a presença de dois dos três critérios apresentados.

**Tabela 1.2** - Critérios de diagnóstico da pancreatite aguda [9].

Parâmetro	Critérios
Clínico	Dor abdominal (início súbito, persistente, severa, epigástrica, com irradiação para o dorso)
Laboratorial	Elevação das concentrações séricas de amilase e/ou lipase (três vezes o limite superior do normal)
Imagiológico	Achados característicos de PA na TCC, RMN ou US abdominal

PA: pancreatite aguda; RMN: ressonância magnética nuclear; TCC: tomografia computadorizada com contraste; US: ultrassonografia

Tradicionalmente, a amilase sérica era o teste diagnóstico de eleição, no entanto, este parâmetro encontra-se elevado em várias condições patológicas, podendo estar normal em cerca de 30% dos casos de PA [118]. Devido à alta sensibilidade (85-100%), especificidade (82-97%) e à elevação mais precoce e sustentada, a lipase sérica tornou-se o principal teste serológico de diagnóstico da PA [119-121].

A ecografia (US, do inglês *ultrasonography*) abdominal é a principal modalidade de imagem para a suspeita de PA de etiologia litiásica, devido ao seu baixo custo, disponibilidade e inexistência de radiação [122,123]. A US, na detecção de litíase, apresenta uma sensibilidade e especificidade acima dos 95%. No caso da PA, em aproximadamente 20% dos doentes, a US evidencia aumento e ecotextura hipoecóica da glândula consistente com edema e ascite [124].

A US endoscópica (EUS) é um teste imagiológico orientado para o estudo da árvore biliar, que pode ser usado em doentes com PA litiásica [125]. Na detecção de coledocolitíase demonstrou uma sensibilidade de 93%, especificidade de 96% e valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de 96% [126]. Embora a presença de necrose pancreática ou de coleções líquidas, complicações usuais na PA grave, dificulte a realização deste exame, ele assume um papel importante, uma vez que vai permitir a confirmação ou exclusão de microlitíase vesicular ou de coledocolitíase não observadas na US abdominal.

Na PA grave, a tomografia computadorizada com contraste (TCC) é um exame útil para distinguir entre PA ligeira e grave, pela presença necrose pancreática, bem como para excluir outras complicações locais [127]. No entanto, estas alterações ocorrem às 72-96 horas de evolução do quadro clínico, o que torna este exame de uso limitado na admissão dos doentes [128,129]. Neste período de tempo, a sua utilização está reservada em dúvidas diagnósticas ou em doentes com quadros clínicos graves [127].

### **1.2.2. Prognóstico**

A avaliação precoce da gravidade da PA é crucial, principalmente na admissão, uma vez que este período é considerado importante para a definição da melhor abordagem terapêutica a adotar [25]. A avaliação do prognóstico foi iniciada, em 1974, por Ranson *et al.* [7]. No entanto, nenhum dos *scores* multifatoriais ou marcadores bioquímicos descritos apresentam uma alta acuidade na avaliação do prognóstico [41,130]. O prognóstico da PA pode ser avaliado recorrendo-se a vários parâmetros, nomeadamente a avaliação clínica, os *scores* multifatoriais, as técnicas imagiológicas, os fatores metabólicos, a predisposição genética, os marcadores serológicos e os perfis proteómico e metabólico.

A avaliação clínica compreende a história clínica e o exame objetivo do doente. A diferenciação entre os graus de gravidade da PA com base na clínica foi analisada em alguns estudos [131]. Foi observada uma sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade na admissão e às 48 horas de início dos sintomas de 34%, 98%, 87%, 83%, 83% e 47%, 100%, 100%, 86%, 87%, respetivamente [131]. Estes resultados mostraram que a avaliação clínica às 48 horas, após o início dos sintomas era uma boa ferramenta de prognóstico da PA [132].

Relativamente aos *scores* multifatoriais, o primeiro a ser publicado foi o *score* de Ranson [7]. Foi proposto, inicialmente, para doentes com PA alcoólica, consistindo em onze parâmetros: cinco avaliados na admissão e seis nas 48 horas após. No sentido de incluir doentes com PA litiásica foi modificado em 1979 [133]. O seu valor preditivo para a gravidade, falência multiorgânica, necrose e mortalidade, foi de 0.810, 0.839, 0.556 e 0.803, respetivamente [24]. As suas principais desvantagens são o cálculo final às 48 horas da admissão do doente e o uso de parâmetros não avaliados no contexto de prática clínica. O *score* de Glasgow surgiu como uma modificação do *score* de Ranson, com a exclusão do hematócrito, *deficit* de base e sequestro de líquidos, e com a inclusão da albumina, apresentando, também, uma alteração no esquema de pontuação [134]. O *score* de Glasgow é uma boa ferramenta prognóstica para a mortalidade, com o VPP de 0.72 [135], sendo independente da etiologia. A sua principal desvantagem é a semelhança com o *score* de Ranson e requerer 48 horas para a sua pontuação final.

O *score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) foi originalmente proposto para a avaliação da gravidade de doentes admitidos em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Mais tarde foi simplificado, assumindo a designação de APACHE-II [136]. Tem sido usado como *score* de referência em vários estudos, tanto para validar novos *scores* multifatoriais como biomarcadores de prognóstico da PA [136]. No entanto, a sua aplicação clínica é difícil, uma vez que requer a avaliação de quinze parâmetros: história de falência multiorgânica grave ou imunocompromisso, idade, temperatura, pressão arterial média, pH, frequência cardíaca e respiratória, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, creatinina, insuficiência renal, hematócrito, leucócitos, escala de coma de Glasgow e a fração inspirada de oxigénio (FiO<sub>2</sub>). Apesar desta complexidade, vários estudos mostraram correlação entre a maior pontuação nas primeiras 72 horas, com a mortalidade. A grande vantagem deste *score* é a avaliação dinâmica do doente.

O *Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis* (BISAP) foi proposto em 2008, como sendo simples, baseado na avaliação de cinco parâmetros clínicos, facilmente disponíveis na admissão ou nas primeiras 24 horas [137]. Vários estudos validaram o valor preditivo deste *score* para a mortalidade na PA [138-141]. O *score* BISAP mostrou ter uma

acuidade semelhante ao APACHE II, sendo uma ferramenta mais fácil de aplicar na prática clínica [142].

O *score* SIRS é simples e amplamente aplicado em ambiente clínico. Durante a fase precoce da PA, a lesão pancreática local provoca distúrbios sistêmicos. É nesta fase que as cascatas de citocinas são ativadas, manifestando-se clinicamente como SIRS. Embora alguns estudos correlacionaram o *score* SIRS com a gravidade da PA [143,144], outros mostraram que este *score* apresentou um valor preditivo mais baixo que APACHE-II para a gravidade da PA [145].

A tabela 1.3 apresenta um resumo de cada *score*, nomeadamente o seu *cutoff*, o tempo de cálculo e a sua acuidade.

**Tabela 1.3** – Relevância clínica dos *scores* multifatoriais na gravidade da pancreatite aguda. Adaptado de Silva-Vaz *et al.* [75].

Score	Cutoff	Tempo	AUC	Referências
Ranson score	≥ 3	48 h	0.81-0.88	[24,145-147]
Glasgow score	2	48 h	0.73-0.784	[135,146,148]
APACHE-II	7	24 h	0.80-0.895	[146,147,149,150]
BISAP	≥ 3	24 h	0.79-0.875	[24,137,145-147]
SIRS	≥ 2	24 h	0.73	[145,146]

AUC: *Area Under the Curve*; APACHE: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; BISAP: *Bedside Index of Severity in acute pancreatitis*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

O prognóstico pode ser também calculado recorrendo-se às diversas técnicas de imagem utilizadas no diagnóstico. Neste sentido, e devido à sua disponibilidade e características de imagem, a TCC é uma modalidade utilizada para o diagnóstico, avaliação da gravidade e classificação morfológica da PA [41], permitindo a caracterização da necrose pancreática e/ou peripancreática, das alterações inflamatórias e da morfologia das coleções líquidas, sendo uma excelente ferramenta para a decisão terapêutica, abordagem e monitorização da resposta ao tratamento [151]. No entanto, na admissão, a TCC não está atualmente indicada, em doentes clinicamente estáveis ou com melhoria clínica [41], uma vez que, quando realizada numa fase precoce, não prevê o desenvolvimento de necrose. Segundo as *guidelines* atuais, a TCC só deve ser realizada quando a situação clínica do doente assim o indicar e pelo menos 72 horas após o início dos sintomas. A sensibilidade e especificidade associadas a esta técnica, para a PA necrotizante, foram de 87.5% e 100%, respetivamente [152]. O primeiro *score* de gravidade de PA, baseado na TCC, foi descrito usando o tamanho, contorno, densidade do pâncreas e alterações peripancreáticas [153]. Adicionando a caracterização da extensão da necrose pancreática, foi proposto o Índice de



Gravidade da TC (CTSI, do inglês, *Computed Tomography Severity Index*) [154]. Posteriormente, foi proposto o CTSI modificado (MCTSI, do inglês *Modified Computed Tomography Severity Index*), mostrando ser mais fácil de calcular e com melhor acuidade para a infecção, falência multiorgânica, necessidade de intervenção cirúrgica ou percutânea, tempo de internamento e mortalidade [155]. Apesar da melhoria da acuidade do MCTSI, não se mostrou superior aos *scores* multifatoriais praticados, não sendo recomendada a sua aplicabilidade na admissão, apenas na avaliação da gravidade da PA em doentes com deterioração do seu estado clínico [9,41].

Muito recentemente os fatores metabólicos, e nomeadamente a síndrome metabólica, foram descritos como marcadores de prognóstico da PA. A síndrome metabólica inclui a obesidade, hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertensão e esteatose hepática [156]. Devido às alterações dos hábitos de vida verificou-se um aumento da sua incidência [157]. Existe pouca informação acerca da relação entre a síndrome metabólica e a PA, sendo os resultados muito variados. No entanto, alguns desses estudos verificaram uma alta prevalência da síndrome metabólica em doentes com PA grave [157-159]. A obesidade tem sido descrita como fator de prognóstico da PA, estando associada ao aumento de complicações extrapancreáticas precoces [160]. Num estudo de base populacional foi verificado que a obesidade mórbida influenciou negativamente os dias de internamento hospitalar, estando associada à falência multiorgânica e a uma elevada mortalidade [161,162]. No entanto, os mecanismos pelos quais a obesidade está associada à gravidade da PA ainda não são totalmente compreendidos. A hiperlipidemia é reconhecida como a terceira causa mais comum de PA [156,163]. Alguns estudos descrevem elevadas concentrações de triglicédeos em doentes com PA de diferentes etiologias, podendo a hiperlipidemia ser um precipitante da PA e um epifenómeno [164]. Os poucos estudos existentes que relacionaram a hiperlipidemia com a gravidade da PA, concluíram que a hipertrigliceridemia correlacionou-se tanto com as complicações locais como sistémicas da PA [159,163,165].

De acordo com o observado na prática clínica, existe uma grande variabilidade de predisposição para a ocorrência da PA em doentes com fatores etiológicos bem identificados. Esta variabilidade está, também, associada a alterações genéticas influenciando o prognóstico da PA. As variações genéticas estudadas foram relacionadas com a produção de citocinas pró-inflamatórias [166], condicionando o resultado clínico dos doentes com PA. Estas variações genéticas estão envolvidas em vários mecanismos, nomeadamente o SO e a via de apoptose. Martins *et al.* [167], relacionaram, com a suscetibilidade de desenvolvimento de PA, as variações genéticas Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*, do inglês, *Glutathione S-Transferase M1*), Glutathione S-transferase Pi1

(*GSTP1*, do inglês, *Glutathione S-Transferase Pii*), Glutathione S-transferase Teta1 (*GSTT1*, do inglês, *Glutathione S-Transferase Theta1*), Caspases 7-10 (*CASP7-10*), linfotóxina- $\alpha$  (*LTA*, do inglês, *Lymphotoxin Alpha*), Tumor de necrose tumoral recetor do membro da superfamília 1B (*TNFRSF1B*, do inglês, *Tumor Necrosis Factor receptor superfamily member 1B*) e proteína do tumor 53 (*TP53*, do inglês *Human Tumor Protein 53*).

Apesar dos fatores descritos anteriormente, os marcadores serológicos são os mais referidos na literatura, como ferramentas de prognóstico com aplicabilidade na prática clínica. Os mais estudados são as IL-6 e -8, proteína C-reativa (PCR), procalcitonina (PCT) e azoto ureico (BUN, do inglês *blood urea nitrogen*). No entanto, e devido à importância da identificação precoce dos doentes com PA grave, vários marcadores continuam a ser estudados.

A IL-6 é o principal estímulo, no fígado, para a síntese proteica em fase aguda e constitui o principal mediador na síntese de fibrinogénio, PCR e hepcidina. Vários estudos confirmaram o seu papel como ferramenta preditiva de gravidade da PA [146,168-170]. A IL-6 tem maior sensibilidade e especificidade para a avaliação precoce da gravidade da PA quando comparada com outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Para um *cutoff* de 50pg/mL foi descrita uma sensibilidade e especificidade de 100% e 89.7%, respetivamente [171]. Apresenta, no entanto, algumas desvantagens, nomeadamente o seu tempo de semivida, o custo e a complexidade do ensaio.

A IL-8 destaca-se na fisiopatologia da PA, tendo sido demonstrada estar significativamente elevada durante o desenvolvimento do processo inflamatório pancreático, e por isso, relacionada com a gravidade da PA [172,173]. Assume um papel na monitorização das complicações sistémicas e falência multiorgânica nos casos de PA necrotizante [174]. Vários estudos verificaram aumentos dos níveis de IL-8 nas primeiras 24 horas após o início dos sintomas, com uma rápida diminuição após 3 a 5 dias, sendo um bom marcador de falência multiorgânica e sepsis, em doentes com PA [175].

A PCR é um reagente de fase aguda sintetizado pelo fígado, induzido por citocinas como a IL-6. Os seus níveis séricos aumentam nas primeiras horas em resposta à inflamação e infeção [176]. É uma ferramenta para o diagnóstico, prognóstico, resposta terapêutica e mortalidade em doentes com PA [177,178]. O valor sérico, atualmente aceite como valor preditivo de gravidade da PA, é  $\geq 150\text{mg/dL}$  às 48 horas após o início dos sintomas, com uma sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 80%, 75%, 67 % e 86%, respetivamente [25,179]. É um marcador comumente usado, barato e clinicamente aceite [176,180,181]. No entanto, os seus níveis são influenciados pela doença hepática crónica que pode estar presente em muitos doentes com PA, obesos e com hábitos etílicos [182]. Apesar da alta

aplicabilidade na prática clínica, este marcador apresenta desvantagens, como o pico tardio (48 a 72 h) e a sua natureza inespecífica como marcador inflamatório [183].

A PCT é um propeptídeo de 116 aminoácidos da hormona calcitonina, que é libertado pelos hepatócitos e células C da glândula tiroideia. É um reagente de fase aguda e vários estudos validaram o seu papel como marcador bioquímico precoce na infeção, sepsis e falência multiorgânica [146,184]. A PCT pode ser usada como uma ferramenta de avaliação precoce do prognóstico da PA [25,185]. Na avaliação da gravidade, para um *cutoff* de 0.5ng/mL foi descrita uma sensibilidade e especificidade de 72% e 86%, respetivamente, sendo o seu valor preditivo de 0.87 [186]. De acordo com as *guidelines* atuais, a PCT é o marcador serológico mais sensível para a deteção de necrose pancreática infetada [41].

Vários *scores*, incluído o de Ranson, incorporam o BUN como marcador de prognóstico e mortalidade da PA [137,187]. Este marcador serológico fornece informações sobre a alteração no *status* do volume intravascular, podendo ser usado na monitorização da resposta à ressuscitação inicial de fluídos [188].

A hepcidina é uma hormona peptídica circulante que regula a entrada de ferro no plasma. Os níveis de hepcidina aumentam durante a inflamação, como resultado do aumento da IL-6 [25,189]. Estudos demonstraram que a hepcidina é sintetizada no fígado, rim, coração, cérebro, músculos do esqueleto e pâncreas [190]. A hepcidina foi descrita, num único estudo, como um marcador de prognóstico da PA, melhor que a PCR [191].

Em estudos da fisiopatologia da PA em modelos murinos, verificou-se que a infiltração e a ativação de neutrófilos PMN pancreáticos nas áreas adjacentes ao tecido adiposo, resultaram na geração de ácido hipocloroso e ácidos gordos, sendo o ácido oleico o mais abundante. Quando foi avaliada a geração de ácidos gordos halogenados nas áreas de necrose em ratos foi verificado que, durante a PA, o tecido adiposo libertou ácido hipocloroso e ácidos gordos, o que exacerbou a SIRS [192]. Com base nestes resultados, foi analisado o papel do ácido oleico como marcador de gravidade da PA, tendo-se concluído que a elevação dos níveis séricos deste marcador correlacionou-se com a gravidade da PA [193].

A razão neutrófilo-linfócito (NLR, do inglês *neutrophil-lymphocyte ratio*) reflete o balanço entre os neutrófilos e linfócitos, sendo um sinal de inflamação sistémica. Uma vez que a razão pode ser calculada através do recurso ao hemograma, não acarreta custos adicionais. Uma elevação da NLR pode efetivamente diferenciar doentes com PA ligeira e grave [194]. No entanto, outros estudos têm verificado resultados controversos [195].

A tabela 1.4 apresenta um resumo de cada marcador serológico referido nomeadamente o seu valor *cutoff*, o tempo de cálculo e a sua acuidade.

**Tabela 1.4** - Relevância clínica dos marcadores serológicos na gravidade da pancreatite aguda. Adaptado de Silva-Vaz *et al.* [75].

Marcador	Cutoff	Tempo	AUC	Referências
IL-6	50 pg/mL	24 h	0.90	[146]
IL-8	196 pg/mL	pré-operatório	0.778	[174]
PCR	150 mg/mL	24 h	0.61	[196]
PCR	150 mg/mL	48 h	0.73-0.91	[146,147,196]
PCT	0.5 ng/mL	24 h	0.86-0.91	[186,197]
PCT	1.77 ng/mL	24 h	0.797	[185]
Hepcidina	234.4 ng/mL	24 h	0.82	[191]
Ácido Oleico	32.4 nM	24 h	1	[193]
NLR	13.64	24 h	0.787	[198]
BUN	5.95 mg/dL	24 h	0.677	[199]

AUC: *Area Under the Curve*; BUN: *Blood Urea Nitrogenic*; IL: *Interleucinas*; NLR: *Neutrophil-Lymphocyte Ratio*; PCR: *Proteína C-reativa*; PCT: *procalcitonina*.

Duas novas técnicas de identificação e quantificação de proteínas e de alterações metabólicas, que ocorrem num determinado processo fisiológico ou patológico em tecidos e fluídos corporais, têm sido descritas. A análise proteômica e metabolômica são duas abordagens sistemáticas, que podem permitir uma melhor compreensão no processo fisiopatológico da PA e assumir um papel no diagnóstico e no prognóstico na fase precoce deste processo inflamatório. A proteômica ou a análise de padrões de proteínas consiste na caracterização e quantificação de proteínas em tecidos e fluídos corporais, constituindo um novo campo em rápida expansão, usado para comparar padrões de expressão de proteínas em diferentes condições patológicas [200,201], nomeadamente na PA. Este método pode permitir a definição de novos biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico [202,203]. A metabolômica, por sua vez, é uma abordagem sistemática para a análise de pequenas moléculas (massa molecular <1000Da) presentes numa determinada amostra biológica, como resultado do metabolismo celular intermediário [204]. Pode fornecer informações detalhadas das alterações metabólicas que ocorrem num determinado processo fisiológico ou patológico [205]. O perfil de metabolitos, descrito na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou espetrometria de massa (GS-MS, do inglês *gas-chromatography/mass spetrometry*), tem sido amplamente aplicado para analisar condições fisiológicas ou patológicas. Na presença de inflamação pancreática, as alterações metabólicas desenvolvem-se antes da transformação da estrutura e função do tecido ou órgão [206]. A identificação destas alterações metabólicas pode promover a compreensão dos eventos fisiopatológicos na PA, bem como na identificação de novos biomarcadores de prognóstico. Apesar do avanço desta técnica são poucos os estudos que se debruçam nesta temática [207]. Villaseñor *et al.* [208], avaliaram o fenótipo metabólico da urina e plasma, recorrendo à <sup>1</sup>H-RMN em 15 doentes com PA de várias etiologias, tendo observado alterações na alanina, valina e hipurato, quando comparados com o grupo controlo.

Concluíram que estes metabolitos podem ser usados como marcadores de diagnóstico de PA. Luszczek *et al.* [209], analisaram na urina de 5 doentes com PA de várias etiologias, o perfil metabolómico usando o <sup>1</sup>H-RMN. Concluíram que os metabolitos identificados por esta técnica permitiam a distinção entre doente com PA e controlos saudáveis. O citrato relacionou-se com o processo inflamatório e com a etiologia alcoólica. Xu *et al.* [210], por sua vez, analisaram o perfil metabolómico sérico em 38 doentes com PA ligeira, de várias etiologias, recorrendo à técnica espectrometria de massa de cromatografia de alta resolução (UPLC-HRMS, do inglês *ultra-performed liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*) e identificaram a decanoil colina, dodecanol e 2-tetradecanona como metabolitos de diagnóstico e esfinganina, L-tironina, ácido glicocólico e 2-tetradecanona como marcadores de resposta à terapêutica. Xiao *et al.* [211], usando a técnica GS-MS, identificaram em 40 doentes com PA de várias etiologias, vários metabolitos de diagnóstico (ácido 3-hidroxibutírico, D-glucose e ácido hexadecenoico) e de prognóstico (ácido 3-hidroxibutírico e o ácido cítrico). Huang *et al.* [212], utilizando a mesma técnica que Xiao *et al.*, analisaram doentes com três etiologias de PA (29 doentes com PA por hiperlipidemia, 20 por PA alcoólica e 27 por PA litiásica) e concluíram que L-tirosina, ácido octadecanóico, colesterol, glicerol 1-hexadecanoato e ácido L-láctico são marcadores de diagnóstico e o ácido (R)-3-hidroxibutírico e o manitol podem ser usados para distinguir PA litiásica do grupo de controlo. Apesar da descrição dos vários metabolitos, principalmente como ferramentas de diagnóstico, apenas um estudo se debruçou no subgrupo de doentes com PA litiásica.



## 2. Objetivos gerais

A identificação precoce de doentes que irão desenvolver PA grave é de extrema importância uma vez que vai permitir, neste subgrupo de doentes, uma monitorização mais apertada, uma terapia de suporte individualizada, a prevenção das complicações associadas e a redução da morbimortalidade.

A etiologia litiásica é a causa mais comum da PA, sendo um mecanismo subjacente ao processo inflamatório pancreático, a passagem dos cálculos biliares no ducto biliar e a sua deposição temporária no esfíncter de Oddi.

Assim, este trabalho tem como objetivo principal contribuir para uma melhor compreensão do conhecimento da fisiopatologia da PA de etiologia litiásica e identificar marcadores de prognóstico, através de um estudo pré-clínico, com recurso a modelos experimentais *in vivo* e de um estudo clínico.

Neste sentido, realizou-se um estudo de investigação translacional, utilizando amostras de soro, plasma e pâncreas de ratos e amostras de soro e plasma de doentes com PA.

Como objetivos mais específicos este projeto de investigação pretende-se:

- 1) Aprofundar a fisiopatologia da PA litiásica através da avaliação do SO e compará-lo às alterações histológicas do pâncreas nos modelos murinos;
- 2) Propor um *score* histológico de gravidade da PA em modelos murinos;
- 3) Avaliar as alterações dos parâmetros inflamatórios e *scores* multifatoriais com as diferentes formas de gravidade da PA litiásica;
- 4) Avaliar o SO e o perfil metabolómico nos diferentes graus de gravidade da PA litiásica;
- 5) Propor novos biomarcadores de prognóstico da PA;
- 6) Identificar possíveis estratégias para a identificação precoce de doentes com PA litiásica grave.





### 3. Material e Métodos

Os trabalhos desenvolvidos para esta tese encontram-se divididos em duas partes: a primeira constituída por um estudo pré-clínico, experimental, com recurso a modelos murinos de PA com o objetivo de aprofundar a fisiopatologia da PA através da avaliação do SO e propor um *score* histológico de gravidade da PA e, uma segunda parte, composta por um estudo clínico, numa amostra de doentes com PA litiásica, onde se pretendeu avaliar os marcadores serológicos e *scores* multifatoriais como ferramentas de prognóstico, analisar o SO e o perfil metabólico no sentido de se identificar novos biomarcadores de prognóstico da PA.

#### 3.1. Estudo Pré-Clínico

O estudo pré-clínico realizado para este projeto pretendeu, em primeiro lugar, a otimização de alguns modelos animais de PA com a definição de um *score* de gravidade de PA baseado na avaliação histológica de amostras de pâncreas e, em segundo lugar, o estudo da fisiopatologia da PA recorrendo-se à análise do SO e do PMM.

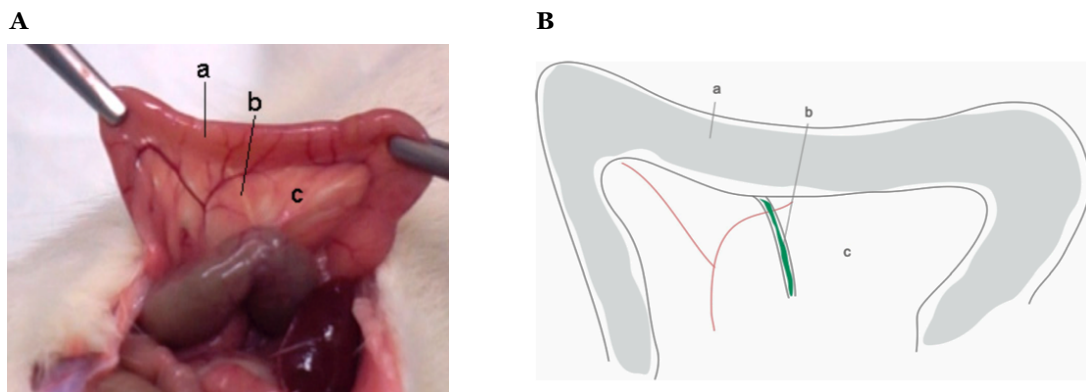
Os animais de laboratório utilizados neste projeto foram ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), adquiridos à Charles River (Charles River, França), com 12 semanas de idade e com pesos compreendidos entre 320 e 350g. Foram mantidos em condições de temperatura, luminosidade e humidade controladas, com acesso *ad libitum* a alimento e água acidada. O estudo foi realizado de acordo com os princípios e procedimentos descritos com “3Rs” nas diretrizes da União Europeia (EU, do inglês *European Union*) (1986/697/Comunidade Económica Europeia (EEC, do inglês *European Economic Community*) e 2010/63/EU), da Federação das Associações Europeias de Ciência de Animais de Laboratório (FELASA, do inglês, *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) e o *National Centre for 3Rs*. Foi aprovado pelo Comité de Ética Animal do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra e pela Direção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV) com a referência 0421/000/000/2018 (anexo I). Foram aplicados os princípios das diretrizes de investigação animal (ARRIVE, do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) para a análise e interpretação dos dados e realizados todos os esforços para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

Foram realizados estudos experimentais no sentido de avaliar a indução de PA através de três modelos: dois cirúrgicos (modelo A - modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum e modelo B - modelo da laqueação duodenal em ansa fechada) que foram comparados com um modelo cirúrgico controlo, e um modelo não cirúrgico (modelo

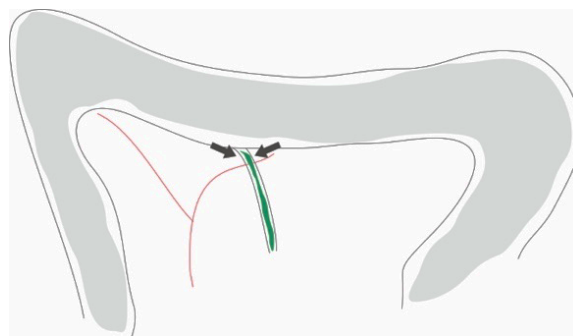
C - modelo de hiperestimulação com análogo da CCK, a ceruleína) comparado com o respetivo modelo controlo, de acordo com a análise serológica das enzimas pancreáticas e a avaliação histológica do tecido pancreático. Neste estudo foram utilizados 8 animais por cada modelo analisado e por cada grupo controlo.

### 3.1.1. Modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum

Os animais foram anestesiados com quetamina (50mg/kg) e clorpromazina (50mg/kg). Segundo técnicas assépticas foi realizada uma laparotomia mediana, com a exposição do duodeno e a identificação do ducto biliopancreático comum, tal como representado na figura 3.1. Procedeu-se à laqueação do ducto biliopancreático junto ao duodeno, como exemplificado esquematicamente na figura 3.2. A laparotomia foi encerrada com pontos totais. Após a intervenção cirúrgica os animais foram individualmente enjaulados, com acesso *ad libitum* a alimento e água acidada por 24 horas. Após este período foi efetuada a colheita de sangue, a occisão dos animais, seguida da necrópsia onde se realizou a pancreatectomia total. Neste ensaio foi utilizado um grupo controlo, onde os animais foram submetidos a uma simples laparotomia.



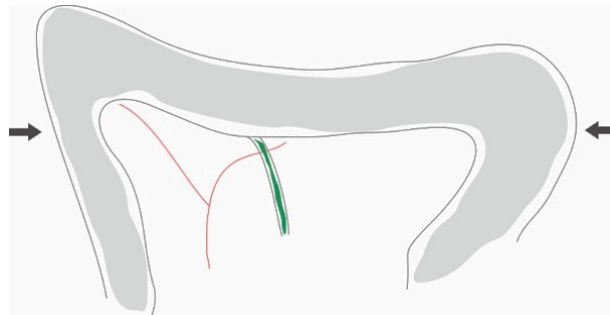
**Figura 3.1** - Anatomia do pâncreas do rato. **A:** fotografia e **B:** representação esquemática. a: duodeno; b: ducto biliopancreático comum; c: pâncreas. Adaptado de Silva-Vaz *et al.* [29].



**Figura 3.2** - Representação esquemática da técnica de indução da pancreatite aguda através da laqueação do ducto biliopancreático comum. As setas indicam o local da laqueação. Adaptado de Silva-Vaz *et al.* [29].

### 3.1.2. Modelo da laqueação duodenal em ansa fechada

Os animais foram anestesiados com quetamina (50mg/kg) e clorpromazina (50mg/kg). Segundo técnicas assépticas foi realizada uma laparotomia mediana, com a exposição do duodeno e a identificação do ducto biliopancreático comum. Procedeu-se à laqueação do duodeno proximal e distalmente ao ducto biliopancreático comum, como exemplificado esquematicamente na figura 3.3. A laparotomia foi encerrada com pontos totais. Após a intervenção cirúrgica os animais foram individualmente enjaulados, com acesso *ad libitum* a alimento e água acidada por 24 horas. Após este período foi efetuada a colheita de sangue, a occisão dos animais, seguida da necrópsia onde se realizou a pancreatectomia total. Neste ensaio foi utilizado um grupo controlo, onde os animais foram submetidos a uma simples laparotomia.



**Figura 3.3** - Representação esquemática da técnica de indução da pancreatite aguda através da laqueação duodenal em ansa fechada. As setas indicam os locais da laqueação: proximal e distal ao ducto biliopancreático comum. Adaptado de Silva-Vaz *et al.* [29].

### 3.1.3. Modelo da hiperestimulação com análogo da colecistoquinina

Os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal, no quadrante inferior direito, de 50µg/kg de ceruleína (Sigma, Taufkirchen, Germany), com intervalo de uma hora, durante 9 horas. Na décima hora de início da indução de PA, os animais foram anestesiados com quetamina (50mg/kg) e clorpromazina (50mg/kg), para serem sacrificados. Foi realizada a colheita de sangue, a occisão dos animais, seguida da necrópsia onde se realizou a pancreatectomia total. Neste ensaio foi utilizado um grupo controlo, onde os animais foram submetidos ao mesmo número de injeções intraperitoneais com uma dose de 50µg/kg de soro fisiológico.

### **3.1.4. Avaliação serológica**

Os animais submetidos à indução da PA através dos modelos cirúrgicos, foram anestesiados, pelo procedimento descrito anteriormente, após 24 horas da laparotomia. Os animais submetidos à indução da PA através do modelo não-cirúrgico, foram anestesiados, também pelo procedimento descrito anteriormente, na décima hora de indução do modelo. Foi colhido sangue através de punção intracardíaca para análise bioquímica. O sangue, após 20 minutos de repouso, foi centrifugado a 1500g durante 10 minutos, tendo-se separado o soro e o plasma. A amilase e a lipase foram analisadas pelo ensaio colorimétrico enzimático pelo Vitros® 5.1 FS Chemistry System. A PCT foi avaliada pelo método de quimioluminescência pelo ADVIA Centaur® CP, Siemens. O restante soro e plasma foram armazenados a -80°C.

### **3.1.5. Avaliação histológica do tecido pancreático**

Foram recolhidas amostras de tecido pancreático nos três modelos murinos descritos anteriormente após a occisão dos animais. As amostras foram inspecionadas, seccionadas em fatias com 3 a 5mm de espessura, fixadas em 4% de formaldeído e incluídas em parafina, tendo sido, posteriormente, seccionadas em cortes de 4µm e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E, Polysciences, Sakura Autostainer - Prisma 81D). A observação foi efetuada por um patologista experiente, de forma duplamente cega, com recurso a microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i) e as imagens foram obtidas utilizando a câmara Nikon – Digital Sight DS-Fi1.

No sentido de se caracterizar, nos modelos animais, os diferentes graus de gravidade da PA, foi proposta, com base na descrição dos parâmetros histológicos: edema, necrose, infiltrado inflamatório, hemorragia e vacuolização e na classificação em ausente, ligeiro, moderado e grave, de acordo com as alterações que se enumeram na tabela 3.1, uma pontuação que se encontra representada na tabela 3.2.

**Tabela 3.1** – Caracterização dos parâmetros histológicos de tecido de pâncreas de modelos murinos de pancreatite aguda

<b>Parâmetros histológicos</b>
<b>Edema</b>
0: ausente 1: ligeiro (interlobar) 2: moderado (intralobar) 3: grave (acinar)
<b>Necrose</b>
0: ausente 1: ligeiro (<10%) 2: moderado (10-30%) 3: grave* (>30%)
<b>Infiltrado inflamatório</b>
0: ausente 1: ligeiro (perivascular) 2: moderado (infiltrado difuso ligeiro) 3: grave (infiltrado difuso abundante)
<b>Hemorragia</b>
0: ausente 1: ligeiro (1-2 focos/slide) 2: moderado (3-5 focos/slide) 3: grave (> 5 focos/slide)
<b>Vacuolização</b>
0: ausente 1: ligeiro (<25% de células acinares) 2: moderado (25-50% de células acinares) 3: grave (> 50% de células acinares)
* necrose grave: pontuação de 12

**Tabela 3.2** - Score histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda

<b>Score de gravidade</b>
0-2: sem pancreatite aguda 3-6: pancreatite ligeira 7-11: pancreatite moderada ≥ 12: pancreatite grave

Esta classificação foi, posteriormente, comparada com o nível sérico de PCT no sentido de se avaliar a discriminação nos diferentes graus de gravidade da PA.

### **3.1.6. Avaliação da lesão oxidativa**

Na avaliação da lesão oxidativa recorreu-se ao plasma dos animais dos dois modelos cirúrgicos – modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum e modelo da laqueação duodenal em ansa fechada, tendo sido incluídos 8 animais por modelo e 8 animais no grupo controlo.

A avaliação da lesão oxidativa foi realizada recorrendo-se à peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica e às defesas antioxidantes, nomeadamente a GR, GPx, CAT, SOD e vitaminas A e E.

Os anticorpos anti-3-nitrotirosina (3-NO) (9691S) foram adquiridos à Cell Signaling (Danvers, MA, EUA). Os anticorpos de cabra anti-4-hidroxinonenal (HNE) (ab5605) foram adquiridos à Abcam (Cambridge, Reino Unido). Os anticorpos de coelho anti-dinitrofenil (DNP, do inglês, *dinitrophenyl*) (D9656) foram adquiridos à Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os anticorpos secundários IgG-HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*) de cabra anti-coelho (sc-2004), IgG-HRP de rato anti-cabra (sc-2354) foram adquiridos à Santa Cruz, Biotechnology, EUA. O substrato WesternBright ECL foi adquirido à Advansta (Menlo Park, CA, EUA). Todos os outros produtos químicos foram comprados à Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A concentração total de proteínas no plasma dos animais foi quantificada usando o Bradford Protein Assay Kit II da Bio-Rad (Hercules, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As absorvâncias foram determinadas a 595nm, pelo espectrofotómetro xMark Microplate da Bio-Rad (Hercules, EUA). A concentração de proteína foi determinada usando diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine serum albumin*) como padrões de calibração. Todos os volumes de amostra foram ajustados com tampão de lise para terem as mesmas concentrações finais de proteína.

### **3.1.6.1. Peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica**

A avaliação da peroxidação lipídica e da nitração das proteínas foi realizada através do método *slot blot*. Cada amostra de plasma foi diluída para uma concentração de 0.05µg/mL usando a solução salina tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate buffered saline*) e transferida para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene difluoride*). As membranas foram previamente ativadas pelo contacto de 1 minuto em metanol, 5 minutos em água esterilizada e 15 minutos em PBS. A técnica foi realizada utilizando um sistema Hybrid-Slot (Biometra, Göttingen, Alemanha). As membranas foram então incubadas em solução Tris com 0.05% de Tween 20 (TBS-T, do inglês *Tris buffered saline-Tween*) contendo 5% de leite magro. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite com anticorpo anti-3-nitrotirosina de coelho (1:5000; 9691S) e anti-4-hidroxinonenal de cabra (1:5000; AB5605). As amostras foram visualizadas usando um anticorpo secundário anti-IgG-HRP de cabra (1:10000; sc-2004) e anti-cabra IgG-HRP (1:10000; sc-2354), respetivamente. As membranas foram submetidas a uma

reação com WesternBright™ ECL (Advansta, Menlo Park, EUA) e visualizadas no Chemidoc MP Imaging System da Bio-Rad (Hercules, EUA). As densidades de cada banda foram obtidas com o Image Lab Software 5.1 da Bio-Rad (Hercules, EUA).

Os grupos carbonilo foram avaliados pelo método *slot blot*. Inicialmente, as amostras foram derivatizadas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) de acordo com o método descrito por Levine *et al.* [213]. Resumidamente, as amostras foram incubadas com dois volumes de 2,4-DNPH 20mM diluídos em ácido trifluoroacético a 10% e incubados por 30 minutos num ambiente escuro. Posteriormente, a reação foi parada usando 1.5 volumes de Tris 2M com 18% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Após este procedimento, as amostras foram diluídas para uma concentração de 0.001 $\mu$ g/ $\mu$ L recorrendo-se a PBS. As membranas de PVDF foram utilizadas na técnica de *slot blot*, realizada pelo sistema Hybrid-slot (Biometra, Göttingen, Alemanha), tendo sido bloqueadas através da incubação durante 90 minutos com TBS com 0.05% contendo leite magro a 5%. Posteriormente, foram incubadas durante a noite com anticorpo anti-DNP de coelho (1:5000; D9656). As amostras foram visualizadas usando IgG-AP de cabra anti-coelho (1:5000; sc2007). As membranas foram submetidas a uma reação com ECF (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e lidas usando BioRad FX-Pro-plus (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido). As densidades de cada banda foram quantificadas usando o software Bio-Profil Bio-1D da Quantity One (VilberLourmat, Marne-la-Vallée, França).

### **3.1.6.2. Defesas antioxidantes**

As defesas antioxidantes estudadas neste trabalho foram a GR, GPx, CAT, SOD e as vitaminas A e E.

A atividade da GR foi avaliada com base na redução da glutathiona oxidada (GSSG) e na reconversão posterior em glutathiona na forma reduzida (GSH) pela GR, utilizando uma molécula de NADPH. Resumidamente, 100 $\mu$ g de proteína do plasma foram diluídos em tampão de ensaio de GR (tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7.5, com 1mM EDTA) e BSA a 1mg/mL. Em seguida, esta mistura foi incubada por 10 minutos, a 25°C num tampão de reação contendo solução de 2mM de GSSG, o tampão de ensaio da GR e 3mM de ácido 2-nitrobenzoico (5,5'-dithiobis) (DNTB). A reação foi iniciada pela adição de 2mM de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH, do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços e a atividade enzimática foi medida após o aumento da absorvância a 412nm, utilizando um espectrofotómetro (Bio-Rad xMARK™, espectrofotómetro de microplaca). A atividade da

GR foi calculada pela média das inclinações, obtidas aos 0 e 88 segundos, utilizando um coeficiente de extinção molar de  $14.15\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  e foi expresso em U/mg.

A quantificação da atividade da GPx foi realizada através de um ensaio de determinação indireta, baseado na GSH em GSSG catalisada pela GPx, que é então acoplada à reciclagem de GSSG de volta ao GSH utilizando GR e NADPH. A oxidação do NADPH em  $\text{NADP}^+$  é indicativa da atividade da GPx. Para a realização deste ensaio, foram diluídos  $50\mu\text{g}$  de proteína do plasma em tampão de ensaio da GPx ( $50\text{mM}$  de Tris-HCl, pH 8.0 contendo  $0.5\text{mM}$  ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)). Posteriormente, foi misturado  $5\text{mM}$  de NADPH,  $42\text{mM}$  de GSH e  $10\text{U/mL}$  de GR. A reação foi iniciada pela adição de  $30\text{mM}$  de solução de hidroperóxido de t-butilo. A atividade da GPx foi medida após a diminuição da absorvância a  $340\text{nm}$  usando um espectrofotômetro (UltrospecR 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) a  $25^\circ\text{C}$ . A atividade da enzima foi determinada usando o coeficiente de extinção molar de  $6.22\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  e expresso em U/mg.

A atividade da CAT foi avaliada com base na medição do substrato de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzido pela ação da CAT. Resumidamente, usou-se  $50\mu\text{g}$  de proteína que foi diluída em tampão fosfato de potássio  $50\text{mM}$ , pH 7.0. A reação foi iniciada pela adição das amostras, o tampão fosfato de potássio e  $10\text{mM}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta mistura foi deixada a reagir durante 5 minutos tendo sido parada pela adição de  $15\text{mM}$  de solução de azida de sódio e transferida para uma nova placa. Em seguida, foi adicionado o reagente colorido composto por  $150\text{mM}$  de tampão de fosfato de potássio, pH 7.0,  $0.25\text{mM}$  de 4-aminoantipirina e  $2\text{mM}$  de ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfônico permanecendo em repouso durante 15 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços e a atividade enzimática foi medida a  $520\text{nm}$  no espectrofotômetro (Bio-Rad xMARKTM, espectrofotômetro de microplaca). A atividade do CAT foi expressa como atividade  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ , na qual uma unidade (U) da atividade da CAT corresponde à quantidade de enzima que decompõe  $1\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  por minuto, pH 7.0 a  $25^\circ\text{C}$ .

A quantificação da atividade da SOD foi realizada com base na reação em que a SOD reduz o anião superóxido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) [214]. Resumidamente, uma mistura de pH 7.8 (contendo  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; tampão fosfato  $216\text{mM}$  (pH 7.8);  $10.7\text{mM}$  de solução de EDTA);  $1.1\text{mM}$  de solução de citocromo C e  $0.108\text{mM}$  de solução de xantina) foi incubada por 5 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . Em seguida, diluiu-se, separadamente,  $50\mu\text{g}$  de proteína do plasma em  $216\text{mM}$  (pH 7.8) de tampão de fosfato de potássio, que foi adicionado à mistura inicial. A reação foi iniciada com a adição da solução da enzima xantina oxidase. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços e a atividade enzimática medida num espectrofotômetro (Bio-Rad xMARKTM, espectrofotômetro de microplaca) a  $550\text{nm}$ . A atividade da enzima foi calculada pela média das inclinações, obtidas aos 0 e 88 segundos.



As concentrações dos substratos foram de 0.05mmol/L para xantina e 0.025mmol/L para INT. A SOD foi calculada pelo grau de inibição e expressa em U/mg.

Os níveis plasmáticos das vitaminas A e E foram quantificados após extração lipídica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) usando uma coluna analítica Spherisorb ODS 1-5 $\mu$ m (250 x 4.6mm), eluída a 2.5mL/minuto com uma solução aquosa de metanol a 90%, a uma temperatura de 45°C, com detecção espectrofotométrica (Gilson, Lewis Center, Ohio, EUA) a 340nm (para a vitamina A) e a 295nm (para a vitamina E), usando o kit Bio-Rad (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em mM.

### **3.1.7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial**

No sentido de se determinar se o processo inflamatório pancreático induz alteração do PMM das mitocôndrias presentes no sangue periférico [215], recorreu-se à utilização do iodeto de 5.5',6.6'-tetracloro-1.1',3.3'-tetraetilbenzimidazolilcarnocianina (JC-1) nas amostras de plasma de acordo com Geng *et al.* e Chakraborty *et al.* [216,217]. O JC-1 é um catião lipofílico que se acumula na mitocôndria de forma dependente do PMM, podendo a fluorescência emitida variar entre o verde (JC-1 na forma de monômero) e vermelho (JC-1 na forma de agregados) mediante a sua concentração mitocondrial. Consequentemente, o aumento do PMM é indicado pela diminuição da razão entre a fluorescência verde (monômeros) e a fluorescência vermelha (agregados) [218].

### **3.1.8. Análise estatística**

Todas as variáveis contínuas foram apresentadas com média  $\pm$  desvio padrão, salvo condições específicas. A distribuição de normalidade das variáveis contínuas foi avaliada com base no teste de Shapiro-Wilk. A associação entre variáveis qualitativas foi testada mediante a aplicação do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram comparadas com o teste *t* de Student e os que não seguiam uma distribuição normal foram analisados com o teste de Mann-Whitney. A comparação entre mais de 2 grupos foi realizada pelo teste ANOVA *post-hoc* para comparações múltiplas e com o teste de Kruskal-Wallis nos casos em que não se verificaram os pressupostos necessários para a aplicação da ANOVA. Exploraram-se associações entre as variáveis através da análise de correlação. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS™ (IBP Corp., Released 1989, 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBP Corp.). Considerando os resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ .

## **3.2. Estudo Clínico**

### **3.2.1. Caracterização demográfica clínica**

No estudo clínico foram incluídos, prospetivamente, doentes internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB com PA litiásica, no período compreendido entre novembro de 2015 e março de 2017. O estudo mereceu a aprovação da Comissão de Ética do HAL-ULSCB (número 10294/15) (anexo II). Os doentes foram informados do presente estudo, tendo-se obtido o consentimento informado de cada doente (anexo III).

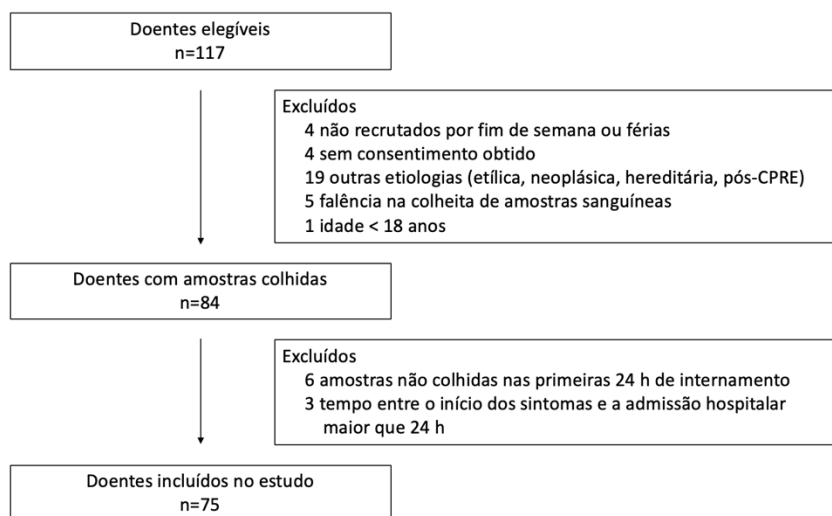
Foram considerados, para este estudo, os tempos da admissão e das 48 horas após o início dos sintomas.

Os fatores de inclusão foram: doentes adultos ( $\geq 18$  anos) com PA definida de acordo com a RAC, pela presença de dois dos três seguintes fatores: (1) dor abdominal consistente com PA; (2) níveis de lipase séricos (ou amilase) pelo menos três vezes maiores que o limite superior do valor normal; (3) e achados característicos de PA na TCC e menos comumente na RMN ou US abdominal. Foram excluídos doentes com outras etiologias de PA, pancreatite recorrente, pancreatite crónica, pancreatite devido a malignidade, doentes grávidas, doentes com tempo superior a 24 horas desde o início da sintomatologia até recorrerem ao Serviço de Urgência. Para confirmação da etiologia litiásica da PA, os doentes foram submetidos a US abdominal para a identificação de cálculos biliares ou microlitíase. Naqueles com dúvida etiológica após a realização de US, foram submetidos a EUS para excluir microlitíase vesicular e coledocolitíase.

As complicações locais e sistémicas foram definidas de acordo com RAC e a SIRS foi definida de acordo com os critérios estabelecidos. A gravidade da PA foi definida de acordo com a RAC [9]: leve (ausência de falência orgânica ou ausência de complicações locais ou sistémicas), moderadamente grave (falência orgânica transitória, isto é, que resolve às 48 horas e/ou presença de complicações locais ou sistémicas sem falência orgânica persistente) e grave (presença de falência orgânica persistente).

O grupo controlo foi constituído por indivíduos saudáveis, tendo sido obtido o consentimento informado de cada participante (anexo III).

A aplicação dos critérios de seleção dos doentes encontra-se no fluxograma representado na figura 3.4.



**Figura 3.4** - Fluxograma dos critérios de seleção dos doentes internados no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco com pancreatite aguda de etiologia litiásica e incluídos no estudo. CPRE: colangiopancreatografia retrógrada endoscópica

Na avaliação do SO, dos 75 doentes incluídos no estudo, foram avaliados os primeiros 15 doentes com PA ligeira e PA moderadamente grave e os 13 doentes com PA grave, perfazendo um total de 43 doentes com PA litiásica e 15 indivíduos saudáveis para grupo controlo. No estudo da metabolómica e partindo desta última amostra, foram analisados, devido à má qualidade de algumas amostras de plasma para uma correta avaliação da técnica: PA ligeira (n=10), moderadamente grave (n=9) e grave (n=10), perfazendo um total de 29 doentes com PA litiásica e 11 indivíduos saudáveis para grupo controlo.

### 3.2.1.1. Recolha das amostras

A cada doente foi realizada colheita de sangue na admissão e após 48 horas do início dos sintomas. Foram colhidos para tubos de 5mL com ácido etilodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) para análise dos leucócitos, monócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas e, para tubos gel de 10mL para análise da amilase, lipase, PCR, BUN, creatinina, Ca<sup>2+</sup>, desidrogenase láctica (LDH, do inglês *Lactate dehidrogenase*), proteínas totais, albumina, PCT e hepcidina. Posteriormente, foram centrifugados por 10 minutos a 1500g. O plasma e o soro restantes foram coletados e armazenados a -80°C.

### 3.2.2. Avaliação dos marcadores serológicos e *scores* multifatoriais de gravidade

Os marcadores serológicos analisados nos doentes com PA litiásica, de acordo com a análise padrão certificada no Serviço de Patologia Clínica da HAL-ULSCB, foram a amilase (U/L), lipase (U/L), leucócitos (WBC, do inglês *white blood count*,  $10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos (N,  $10^3/\mu\text{L}$ ), monócitos (M,  $10^3/\mu\text{L}$ ), linfócitos (L,  $10^3/\mu\text{L}$ ), plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ), PCR (mg/mL), BUN (mg/dL), creatinina (mg/dL),  $\text{Ca}^{2+}$  (mg/dL), LDH (U/L), proteínas totais (g/dL), albumina (g/dL) e PCT (ng/mL). Foram calculadas as NLR, razão plaquetas/linfócitos (PLR, do inglês *platelet-lymphocyte ratio*) e o Índice de resposta inflamatória sistêmica (SIRI, do inglês *Systemic Inflammatory Response Index*) através da fórmula:  $\text{SIRI} = N \times M \div L$ . Relativamente à hepcidina (ng/mL), foram analisadas 66 amostras de soro às 48 horas do início dos sintomas: PA ligeira (n=41), moderadamente grave (n=13) e grave (n=12), tendo sido determinados usando um kit comercial ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante.

Os *scores* multifatoriais avaliados nos doentes com PA litiásica, foram o BISAP, SIRS e o *score* de Marshall Modificado (MMS, do inglês *modified Marshall score*). O *score* BISAP consiste num método simples de avaliação precoce do risco de mortalidade de doentes com PA. É constituído por cinco parâmetros que avaliam o nível de BUN ( $\geq 25\text{mg/dL}$ ), alteração do estado de consciência, SIRS, idade ( $\geq 60$  anos) e a presença de derrame pleural [137]. O *cutoff* usado para a avaliação da gravidade e mortalidade é de  $\geq 3$  [24]. O *score* da SIRS é simples e amplamente usado em ambiente clínico. Avalia quatro parâmetros: temperatura ( $<36^\circ\text{C}$  ou  $>38^\circ\text{C}$ ), frequência respiratória ( $>20$  respirações/minuto) ou  $\text{PaCO}_2$  ( $<32\text{mmHg}$ ), pulso ( $>90$  batimentos/minuto) e leucócitos ( $<4000$  ou  $>12000$  células/ $\text{mm}^3$  ou  $>10\%$  de bandas imaturas). O SIRS é definido pela presença de  $\geq 2$  dos parâmetros descritos [143]. O MMS permite a avaliação da falência multiorgânica na PA [9]. A falência multiorgânica inclui um ou mais dos seguintes parâmetros: choque (pressão sanguínea  $<90\text{mmHg}$ ); insuficiência respiratória ( $\text{PaO}_2 < 60\text{mmHg}$  em ar ambiente ou na necessidade de ventilação mecânica) e falência renal (creatinina  $> 2\text{mg/dL}$  após hidratação ou hemodiálise). A falência orgânica está presente para um *cutoff*  $\geq 2$ . No presente estudo, os *scores* descritos foram avaliados na admissão e às 48 horas de início dos sintomas.

### **3.2.3. Avaliação da lesão oxidativa e do potencial de membrana mitocondrial**

A análise do SO e do PMM seguiram os métodos que se encontram descritos no estudo pré-clínico deste capítulo nas seções 3.1.6 e 3.1.7, respetivamente.

### **3.2.4. Análise estatística**

Todas as variáveis contínuas foram apresentadas com média  $\pm$  desvio padrão, salvo condições específicas. A distribuição de normalidade das variáveis contínuas foi avaliada com base no teste de Shapiro-Wilk. A associação entre variáveis qualitativas foi testada mediante a aplicação do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram comparadas com o teste *t* de Student e as que não seguiam uma distribuição normal foram analisadas com o teste de Mann-Whitney. A comparação entre mais de 2 grupos foi realizada pelo teste ANOVA *post-hoc* para comparações múltiplas e com o teste de Kruskal-Wallis nos casos em que não se verificaram os pressupostos necessários para a aplicação da ANOVA. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS™ (IBP Corp., Released 1989, 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBP Corp.). Considerando os resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ .

### **3.2.5. Avaliação do perfil metabolómico por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton**

Na análise do perfil metabolómico de doentes com PA litiásica, várias amostras de plasma foram descongeladas, homogeneizadas usando vórtice e centrifugadas (9480 g, 5 minutos). A 160  $\mu$ L de plasma foi adicionada 65  $\mu$ L de solução de fumarato em D<sub>2</sub>O (2.9mM, pH 7.0). Após homogeneização e centrifugação (9480 g, 5 minutos), 200  $\mu$ L de cada amostra foram transferidos para um tubo de RMN de 3 mm e analisados. Os espectros de RMN foram adquiridos num espectrómetro Varian Inova 600 MHz (14.1 T) equipado com uma sonda QXI de 3mm com gradiente z. Os ensaios de <sup>1</sup>H 1D cpmg (sequência de pulso *spin-eco* de Carr-Purcell-Meiboom-Gill) com pré-saturação da água foram adquiridos a 298K usando os seguintes parâmetros: largura espectral de 7.2KHz, ângulo de pulso de 90°, atraso de relaxamento de 4 segundos com 2.5 segundos de saturação de água e tempo de aquisição de 2.5 segundos. Foram coletados 128 scans, com descarte dos primeiros 8, relaxamentos *spin-spin* de 0.75ms e 374 *loops*. As frequências de saturação da água foram otimizadas para cada amostra. Os espectros foram processados aplicando ampliação de linha exponencial (lb 0.3Hz), prendimento zero de 64k, faseamento manual e correção da linha de base. Os

desvios químicos foram internamente referenciados ao singlete de fumarato a 6.50ppm. A atribuição de metabolitos foi baseada na comparação com dados publicados anteriormente e espectros de referência disponíveis em bancos de dados públicos com o HMDB [219]. Além disso, os espectros 2D TOCSY homonucleares foram registrados para ajudar na atribuição espectral [220].

As amostras de dados para análise multivariada foram criadas no Amix-viewer (versão 3.9.15, BrukerBiospin, Rheinstetten) usando todos os valores de intensidade na região de 0.75-8.5ppm, com exclusão das regiões de água e fumarato, além das regiões sem sinais. Os espectros processados foram alinhados para minimizar as variações de deslocamento [221] e normalizados por área integral total para contabilizar os efeitos de diluição da matriz [222]. A análise multivariada foi realizada em Simca 14 (Umetrics, Umea, Suécia) em matrizes de dados em escala de variação de unidade. A estrutura inicial dos dados foi avaliada pela análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*), seguida pela análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *partial least squares discriminant analysis*) para identificar a contribuição do metabolito para a separação de classes. As cargas PLS-DA foram calculadas multiplicando os pesos variáveis ( $w$ ) pelos respectivos desvios-padrão e codificados por cores de acordo com o tamanho da variável importância para os valores de projeção (VIP). VIP > 1 foram considerados relevantes para a separação do grupo. A validação cruzada padrão de 7 vezes e o teste de permutação [223] foram utilizados para validar a variação observada ( $R^2$ ) e o potencial preditivo ( $Q^2$ ) dos modelos PLS-DA. Além disso, picos bem resolvidos de metabolitos relevantes foram integrados (visualizados Amix, versão 3.9.15, BrukerBiospin, Rheinstetten) e normalizados por áreas integrais totais. Os efeitos biológicos para áreas normalizadas foram estimados calculando o tamanho do efeito. Além disso, os dados foram analisados por ANOVA bidirecional, seguida pelos testes *post-hoc* de Tukey (Graph-Pad Prism 6 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 4. Resultados

### 4.1. Estudo Pré-Clínico

No início do projeto foram estabelecidos vários modelos murinos de PA, tendo em vista a otimização do modelo ou modelos a utilizar. Foram realizados múltiplos ensaios, tendo sido escolhidos, para a avaliação da PA os modelos: Modelo A - modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum, Modelo B - modelo da laqueação duodenal em ansa fechada e o Modelo C - modelo de hiperestimulação com análogo da CCK, a ceruleína. Os modelos A e B foram escolhidos para a avaliação da PA de etiologia litiásica.

#### 4.1.1. Avaliação serológica

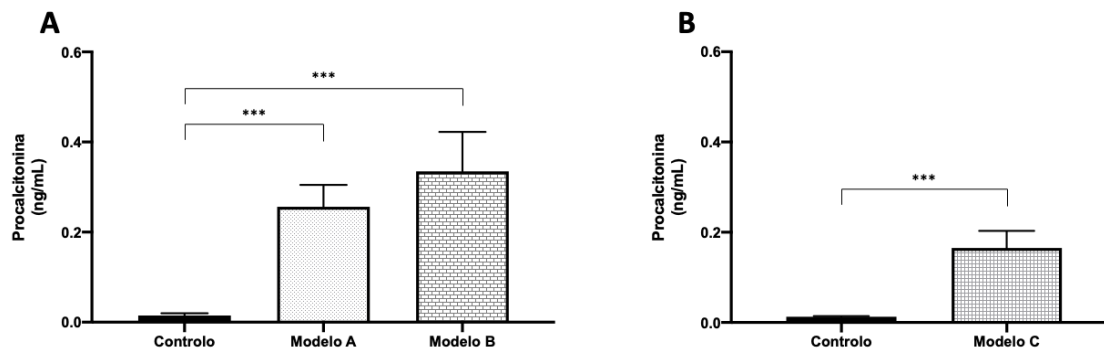
Na avaliação da indução da PA nos modelos murinos, recorreu-se à análise dos níveis de amilase e de lipase.

**Tabela 4.1** – Avaliação dos níveis de amilase e lipase nos modelos murinos de pancreatite aguda e grupos controlo. Modelo A (modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum); Modelo B (modelo da laqueação duodenal em ansa fechada); e, Modelo C (modelo de hiperestimulação com a ceruleína). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, em U/L. Medição realizada pelo ensaio colorimétrico enzimático. (n=8) As diferenças significativas entre os controlos e os modelos estão assinaladas por \*, onde \*\*\* representa  $p < 0.001$  (teste de Mann-Whitney).

	Controlo	Modelo A	Modelo B	Controlo	Modelo C
<b>Amilase</b>	1845 $\pm$ 410	6424 $\pm$ 752 ***	7243 $\pm$ 1096 ***	2395 $\pm$ 363	15637 $\pm$ 5413 ***
<b>Lipase</b>	99 $\pm$ 24	846 $\pm$ 448 ***	907 $\pm$ 463 ***	118 $\pm$ 12	6169 $\pm$ 3526 ***

Os dados obtidos, expressos na tabela 4.1, mostraram uma elevação significativa dos níveis da amilase entre os controlos e os modelos de indução de PA (Modelo A: 1845 $\pm$ 410U/L vs 6424 $\pm$ 752U/L:  $p < 0.001$ ; Modelo B: 1845 $\pm$ 410U/L vs 7243 $\pm$ 1096U/L:  $p < 0.001$  e Modelo C: 2395 $\pm$ 363U/L vs 15637 $\pm$ 5413U/L:  $p < 0.001$ ) e da lipase (Modelo A: 99 $\pm$ 24U/L vs 846 $\pm$ 448U/L:  $p < 0.001$ ; Modelo B: 99 $\pm$ 24U/L vs 907 $\pm$ 463U/L:  $p < 0.001$  e Modelo C: 118 $\pm$ 12U/L vs 6169 $\pm$ 3526U/L:  $p < 0.001$ )

No sentido de se avaliar o processo inflamatório procedeu-se à quantificação da PCT, tendo-se comparado os controlos e os modelos murinos de PA, como representado na figura 4.1.



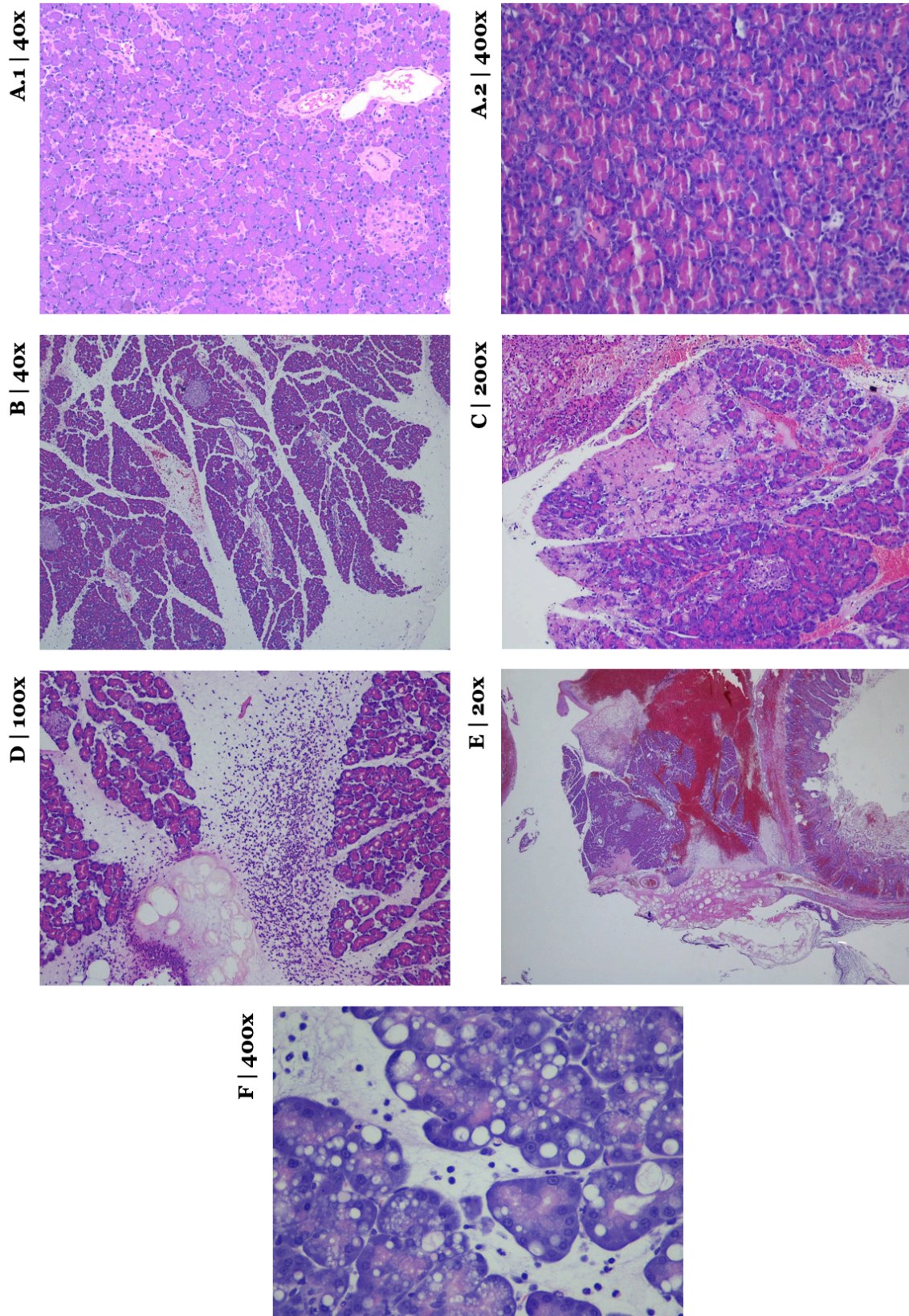
**Figura 4.1** - Avaliação dos níveis de procalcitonina nos modelos murinos de pancreatite aguda e grupos controle. **A**, níveis de procalcitonina no Modelo A (modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum) e Modelo B (modelo da laqueação duodenal em ansa fechada) comparada com o grupo controle. **B**, níveis de procalcitonina no Modelo C (modelo de hiperestimulação com a ceruleína) comparada com o grupo controle. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pelo método de quimioluminescência. (n=8) As diferenças significativas entre os controles e os modelos estão assinaladas por \*, onde \*\*\* representa  $p < 0.001$  (teste de Mann-Whitney).

Da análise dos resultados, expressos na figura 4.1, observou-se que todos os modelos apresentaram elevações significativas dos níveis de PCT relativamente ao controlo (Modelo A:  $0.26 \pm 0.14 \text{ ng/mL}$  vs  $0.01 \pm 0.01 \text{ ng/mL}$ :  $p < 0.001$ ; Modelo B:  $0.34 \pm 0.25 \text{ ng/mL}$  vs  $0.01 \pm 0.01 \text{ ng/mL}$ :  $p < 0.001$  e Modelo C:  $0.15 \pm 0.11 \text{ ng/mL}$  vs  $0.01 \pm 0.01 \text{ ng/mL}$ :  $p < 0.001$ ).

#### 4.1.2. Avaliação histológica do tecido pancreático

O tecido pancreático foi submetido a avaliação histológica, tendo sido considerados os seguintes parâmetros: edema, necrose, infiltrado inflamatório, hemorragia e vacuolização, tendo sido classificados em ausente, ligeiro, moderado e grave, de acordo com as alterações encontradas. As imagens histológicas resultantes desta avaliação são apresentadas na figura 4.2: A.1 e A.2, que correspondem a imagens histológicas de um pâncreas normal; B, representa o edema induzindo afastamento dos ácinos pancreáticos; em C são revelados focos de necrose pancreática; em D é apresentado o infiltrado inflamatório rico em PMN envolvendo os ácinos pancreáticos; em E é representado o duodeno e pâncreas adjacente com marcada hemorragia; e em F, observam-se os ácinos pancreáticos exibindo vacuolização citoplasmática.





**Figura 4.2** – Avaliação histológica de tecido pancreático de modelos murinos de pancreatite aguda. Utilização de microscopia ótica em lâminas coradas com H&E. **A.1** e **A.2**, pâncreas normal (40x e 400x); **B**, edema (40x); **C**, necrose pancreática (200x); **D**, infiltrado inflamatório (100x); **E**, hemorragia (40x); **F**, vacuolização (400x). H&E: Hematoxilina e Eosina.

Quando se analisaram as alterações histológicas nos modelos murinos, verificou-se que 83,3% dos animais desenvolveram edema, 79,2% necrose, 54,2% infiltrado inflamatório, 41,7% hemorragia e 37,5% vacuolização. Os dados da análise das alterações histológicas em cada modelo murino, mostraram que, no Modelo A, a ausência de edema ocorreu em 25% dos animais e quando presente foi ligeiro em 12,5%, moderado em 37,5% e grave em 25%; a necrose esteve presente em todos os animais, em 12,5% foi ligeira, em 62,5% moderada e em 25% foi grave; o infiltrado inflamatório foi ausente em 25%, em 25% foi ligeiro, moderado em 50% e ausência de formas graves; a hemorragia esteve ausente em 25%, foi ligeira em 62,5% e moderada em 12,5%, não se observando alterações na forma grave; não se verificaram alterações compatíveis com a vacuolização. A PA neste modelo foi classificada como ligeira em 25%, moderada em 50% e 25% dos casos em PA grave. No modelo B foram observados todos os parâmetros em estudo. O edema foi ausente em 25%, não se observaram formas ligeiras, 25% foi moderado e 50% grave; a necrose foi ausente em 12,5%, ligeira em 12,5%, moderada em 50% e grave em 25%; o infiltrado inflamatório esteve ausente em 25% dos animais, 12,5% foi ligeiro, moderado em 37,5% e grave em 25%; a hemorragia foi ausente em 50% e presente nos restantes 50% na forma ligeira; a vacuolização este ausente em 75% e foi ligeira em 25% dos animais. Assim, 25% dos animais foram classificados com PA ligeira, 50% em moderada e 25% em PA grave. Por sua vez, quando se analisou o modelo C, verificou-se edema ligeiro em 50% dos animais e moderado nos restantes; a necrose esteve ausente em 50% e sob a forma de ligeira nos restantes 50% dos animais; o infiltrado inflamatório esteve ausente em 87,5% dos animais e presente como ligeiro em 12,5%; a hemorragia não foi observada em nenhum dos animais; a vacuolização foi ausente em 12,5%, ligeira em 12,5%, moderada em 62,5% e grave em 12,5% dos animais. A PA foi classificada como ligeira em todos os animais avaliados.

**Tabela 4.2** – Avaliação dos parâmetros histológicos incluídos no *score* histológico proposto dos modelos murinos de pancreatite aguda e grupos controle.

Parâmetros histológicos		Score	Amostra (n=40)
<b>Edema</b>	Ausente	0	12%
	Ligeiro (interlobar)	1	47%
	Moderado (intra-lobar)	2	25%
	Grave (acinar)	3	15%
<b>Necrose</b>	Ausente	0	48%
	Ligeiro (<10%)	1	20%
	Moderado (10-30%)	2	22%
	Grave (>30%)	3	10%
<b>Infiltrado inflamatório</b>	Ausente	0	62%
	Ligeiro (perivascular)	1	15%
	Moderado (infiltrado difuso ligeiro)	2	18%
	Grave (infiltrado difuso abundante)	3	5%
<b>Hemorragia</b>	Ausente	0	75%
	Ligeiro (1-2 focos/slide)	1	23%
	Moderado (3-5 focos/slide)	2	2%
	Grave (> 5 focos/slide)	3	0%
<b>Vacuolização</b>	Ausente	0	74%
	Ligeiro (<25% células acinares)	1	8%
	Moderado (25-50% células acinares)	2	15%
	Grave (> 50% células acinares)	3	3%

No sentido de se poder diferenciar os graus de gravidade de PA, foi proposto um *score* baseado nas alterações histológicas do tecido pancreático colhido nos modelos murinos. Foram avaliados os parâmetros histológicos descritos na tabela 3.1 e aplicada a pontuação expressa na tabela 3.2. Os achados dos parâmetros histológicos na amostra total de animais com PA e grupos controles (n=40) encontram-se descritos na tabela 4.2. Os níveis de amilase, lipase e PCT foram analisados nos três grupos de gravidade e estão representados na tabela 4.3.

**Tabela 4.3** – Avaliação dos níveis de amilase, lipase e procalcitonina de acordo com o *score* histológico nos modelos murinos de pancreatite aguda. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, em U/L para a amilase e lipase e em ng/ml para a procalcitonina. Medição realizada pelo ensaio colorimétrico enzimático no estudo da amilase e lipase e pelo método de quimioluminescência no estudo da procalcitonina. (teste de Kruskal-Wallis).

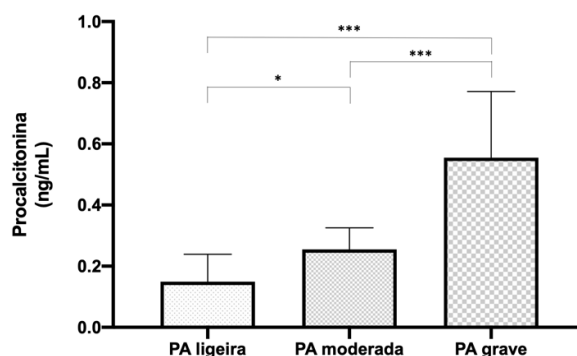
Marcadores serológicos	PA ligeira (n=12)	PA moderada (n=8)	PA grave (n=4)	P
<b>Amilase</b>	11770 $\pm$ 6751	6888 $\pm$ 1152	6575 $\pm$ 1005	NS
<b>Lipase</b>	3922 $\pm$ 4097	941 $\pm$ 524	979 $\pm$ 271	NS
<b>PCT</b>	0.14 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.22	<0.001

NS: *not significant*; PA: pancreatite aguda; PCT: procalcitonina

Os resultados, expressos na tabela 4.3, revelaram que tanto a amilase como a lipase não apresentaram alterações entre os graus de gravidade da PA (p=0.064 e p=0.189,

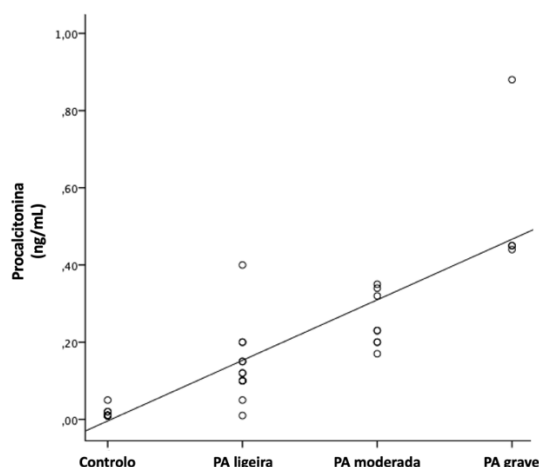
respetivamente). A PCT, por sua vez, apresentou diferenças significativas no *score* histológico ( $p < 0.001$ ).

Atendendo aos achados relativos à PCT, avaliou-se o nível deste marcador inflamatório em cada grau de gravidade da PA, como representado na figura 4.3.



**Figura 4.3** - Avaliação da procalcitonina no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pelo método de quimioluminescência. As diferenças significativas entre os diferentes graus de gravidade de pancreatite aguda estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher). PA: pancreatite aguda.

Através da análise da figura 4.3, verificou-se que houve uma elevação significativa dos níveis de PCT entre a PA ligeira e a moderada ( $0.14 \pm 0.10 \text{ ng/mL}$  vs  $0.26 \pm 0.07 \text{ ng/mL}$ :  $p = 0.032$ ), entre a PA ligeira e a grave ( $0.14 \pm 0.10 \text{ ng/mL}$  vs  $0.56 \pm 0.22 \text{ ng/mL}$ :  $p < 0.001$ ) e entre a PA moderada e a grave ( $0.26 \pm 0.07 \text{ ng/mL}$  vs  $0.56 \pm 0.22 \text{ ng/mL}$ :  $p < 0.001$ ).



**Figura 4.4** - Diagrama de dispersão do *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda com os níveis séricos de procalcitonina. Observou-se um coeficiente de correlação de Spearman ( $r = 0.917$ ;  $p < 0.001$ ).

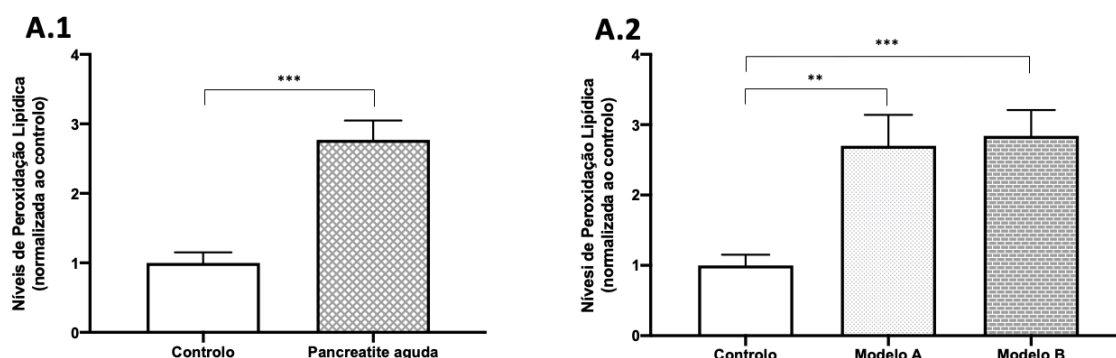
Foi observada, segundo o diagrama de dispersão expresso na figura 4.4, uma correlação entre os níveis de PCT e o *score* histológico de gravidade de PA ( $r=0.917$ ) indicando que a gravidade do *score* reflete o processo inflamatório pancreático.

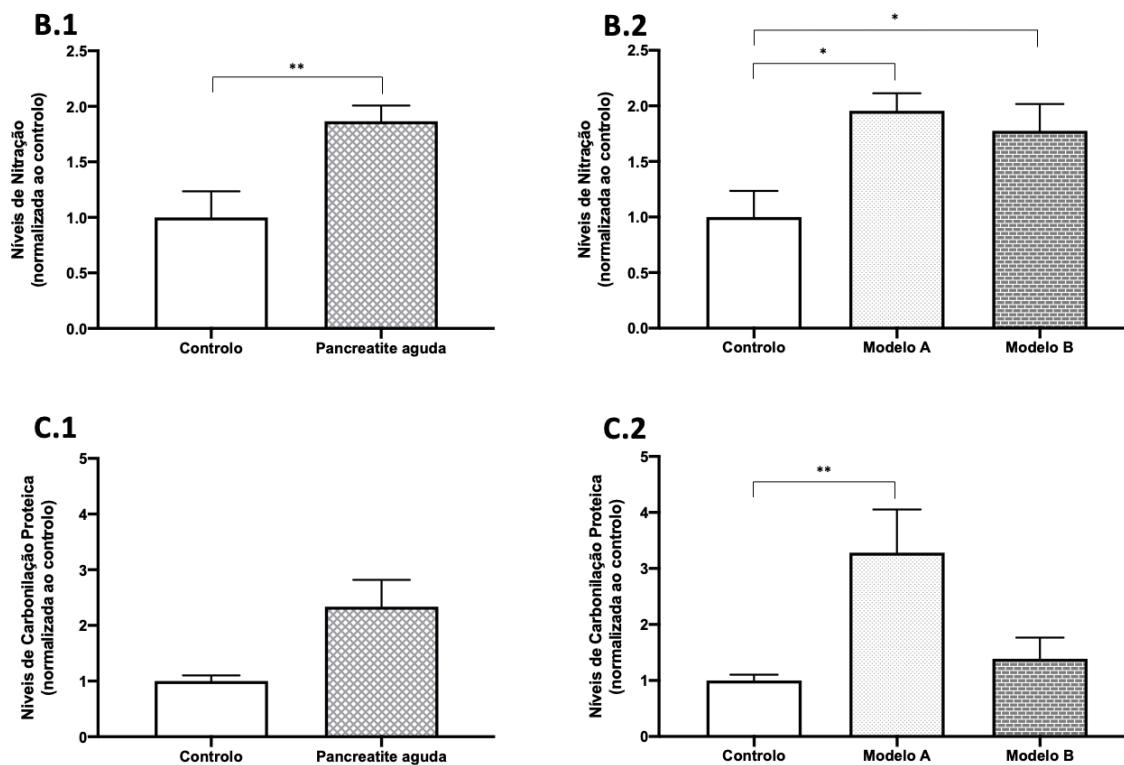
#### 4.1.3. Avaliação da lesão oxidativa

Com o intuito de se aprofundar o conhecimento do processo fisiopatológico da PA, foram avaliados marcadores de SO, um dos mecanismos associados à patogênese e progressão deste processo inflamatório. A avaliação decorreu em dois modelos murinos: modelo A ( $n=8$ ) - modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum e o modelo B ( $n=8$ ) - modelo da laqueação duodenal em ansa fechada, tendo-se analisado a atividade das ROS, das defesas antioxidantes e do PMM, em comparação com o grupo controlo ( $n=8$ ). Na avaliação da gravidade da PA foi aplicado o *score* histológico nos 16 animais que constituem os modelos cirúrgicos, tendo-se obtido a seguinte distribuição: PA ligeira ( $n=4$ ), PA moderada ( $n=8$ ) e PA grave ( $n=4$ ).

##### 4.1.3.1. Peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica

A avaliação dos níveis das ROS encontra-se representada na figura 4.5. Foram analisados os níveis de HNE para o estudo da peroxidação lipídica, de 3-NO para a nitração das proteínas e os níveis de carbonilação proteica, entre o grupo controlo e os modelos murinos de PA.



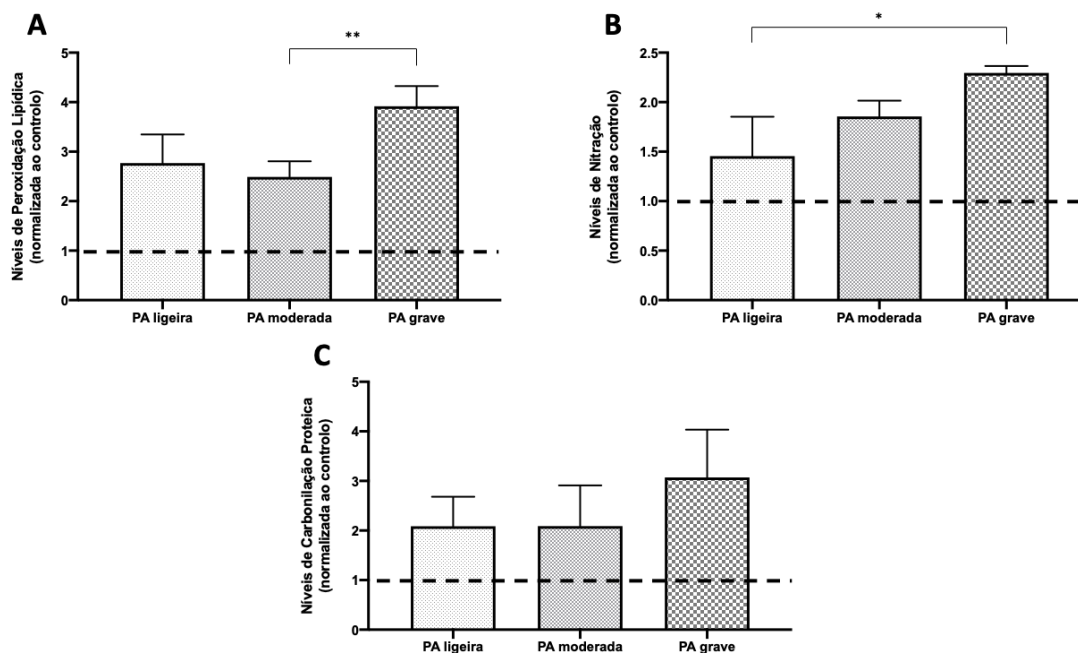


**Figura 4.5** - Avaliação dos níveis das espécies reativas de oxigénio nos modelos murinos de pancreatite aguda. **A.1** e **A.2**, Níveis de peroxidação lipídica pela atividade da HNE, **B.1** e **B.2**, Níveis da nitração pela atividade da 3-NO e **C.1** e **C.2**, Níveis da carbonilação proteica. Modelo A (modelo de laqueação do ducto biliopancreático comum) e Modelo B (modelo da laqueação duodenal em ansa fechada). HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; 3-NO: 3-nitro-tirosina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo, ao qual foi atribuído o valor de 1. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pelo método *slot blot*. (n=8, por grupo). As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$ , \*\* representa  $p < 0.01$ , \*\*\* representa  $p < 0.001$  (Teste de Mann-Whitney).

Da análise dos resultados, expressos na figura 4.5-A.1 e A.2, observou-se um aumento significativo nos níveis de HNE entre o grupo controlo e os animais com PA ( $2.77 \pm 1.11$  normalizada ao controlo:  $p < 0.001$ ), e um aumento significativo, quer no modelo A ( $2.70 \pm 1.25$  normalizada ao controlo:  $p = 0.001$ ), quer no modelo B ( $2.84 \pm 1.04$  normalizada ao controlo:  $p < 0.001$ ). Quando se compararam os níveis de 3-NO, expressos na figura 4.5-B.1 e B.2, verificou-se um aumento significativo entre o grupo controlo e os animais com PA ( $1.87 \pm 0.56$  normalizada ao controlo:  $p = 0.006$ ), no modelo A ( $1.96 \pm 0.44$  normalizada ao controlo:  $p = 0.015$ ) e no modelo B ( $1.78 \pm 0.68$  normalizada ao controlo:  $p = 0.028$ ). Por sua vez, quando se analisaram os níveis de carbonilação proteica, representados na figura 4.5-C.1 e C.2, observou-se uma tendência para o seu aumento entre o grupo controlo e os animais com PA, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $2.33 \pm 1.93$  normalizada ao controlo:  $p = 0.106$ ). Quando se avaliaram os modelos individualmente, só o modelo A apresentou uma elevação dos níveis de carbonilação proteica com significado estatístico ( $3.28 \pm 2.18$  normalizada ao controlo:

$p=0.001$ ), enquanto no modelo B não se observaram alterações estatisticamente significativas ( $1.39 \pm 1.07$  normalizada ao controlo:  $p=0.878$ ).

Na figura 4.6 encontra-se expressa a comparação entre o nível das ROS e o *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de PA.



**Figura 4.6** - Avaliação dos níveis das espécies reativas de oxigénio no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda. **A**, Nível de peroxidação lipídica pela atividade da HNE, **B**, Nível de nitração pela atividade da 3-NO e **C**, Nível da carbonilação proteica nos graus de gravidade da PA. HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; 3-NO: 3-nitrotirosina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo, ao qual foi atribuído o valor de 1. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pelo método *slot blot*. PA ligeira (n=4), PA moderada (n=8) e PA grave (n=4). As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  e \*\* representa  $p < 0.01$  (ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher). PA: pancreatite aguda.

Os dados obtidos relativamente aos níveis de HNE, representados na figura 4.6-A, revelaram não existir diferenças estatisticamente significativas entre a PA ligeira e a moderada ( $2.77 \pm 1.16$  vs  $2.20 \pm 0.81$  normalizada ao controlo:  $p=0.320$ ), uma tendência para o aumento entre a PA ligeira e a grave, embora sem significado estatístico ( $2.77 \pm 1.16$  vs  $3.92 \pm 0.82$  normalizada ao controlo:  $p=0.096$ ) e um aumento com significado estatístico entre a PA moderada e a grave ( $2.20 \pm 0.81$  vs  $3.92 \pm 0.82$  normalizada ao controlo:  $p=0.008$ ). Relativamente aos níveis de 3-NO, expressos na figura 4.6-B, observou-se um aumento significativo entre os níveis da PA ligeira e a grave ( $1.45 \pm 0.79$  vs  $2.30 \pm 0.14$  normalizada ao controlo:  $p=0.036$ ), verificando-se apenas uma tendência para o aumento entre a PA ligeira e a moderada e entre a PA moderada e a grave, ambas sem significado

estatístico ( $1.45 \pm 0.79$  vs  $1.86 \pm 0.50$  normalizada ao controlo:  $p=0.220$  e  $1.86 \pm 0.50$  vs  $2.30 \pm 0.14$  normalizada ao controlo:  $p=0.182$ , respetivamente). Quando se analisou a carbonilação proteica, representada na figura 4.6-C, verificou-se uma tendência para o aumento dos seus níveis entre a PA ligeira e a grave ( $2.09 \pm 1.18$  vs  $3.07 \pm 1.92$  normalizada ao controlo:  $p=0.502$ ) e entre a PA moderada e a grave ( $2.09 \pm 2.31$  vs  $3.07 \pm 1.92$  normalizada ao controlo:  $p=0.441$ ), embora sem significado estatístico e sem diferenças estatisticamente significativa entre a PA ligeira e a moderada ( $2.09 \pm 1.18$  vs  $2.09 \pm 2.31$  normalizada ao controlo  $p=0.998$ ).

#### 4.1.3.2. Defesas antioxidantes

Na avaliação das defesas antioxidantes recorreu-se ao estudo dos níveis de GR, GPx, CAT, SOD, vitamina A e vitamina E. A tabela 4.4 e a figura 4.7 representam os resultados obtidos entre o grupo controlo e os modelos murinos de PA.

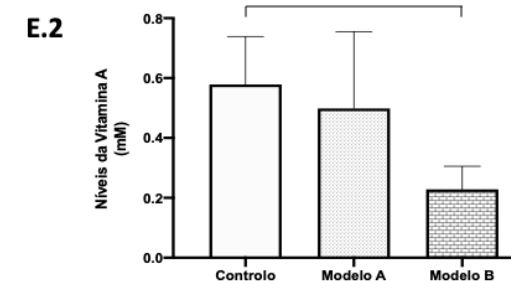
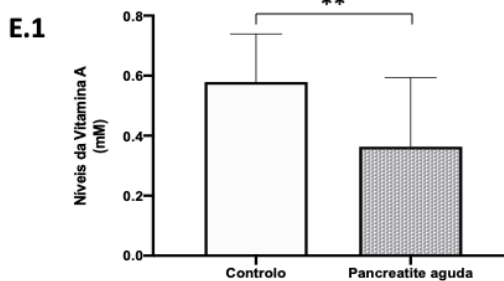
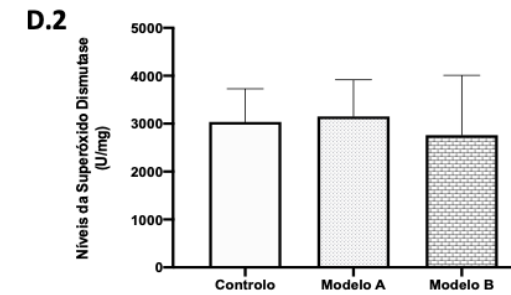
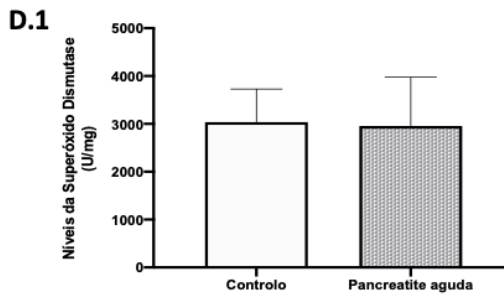
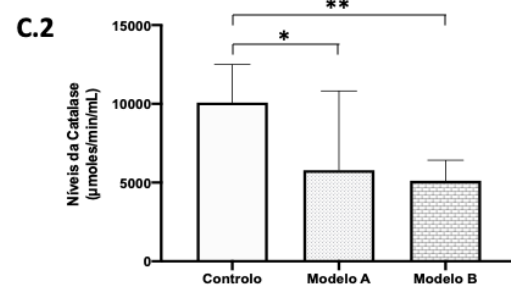
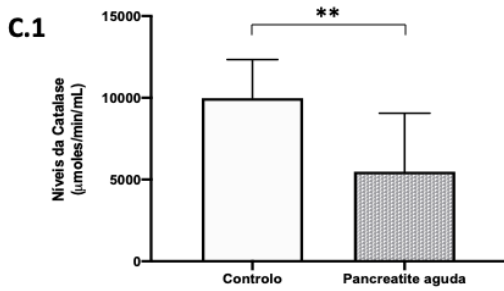
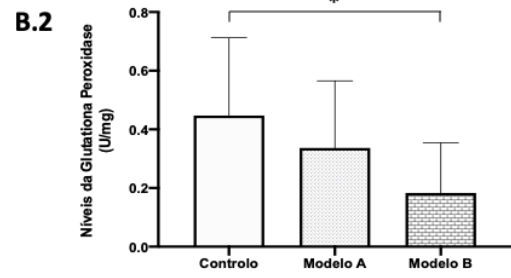
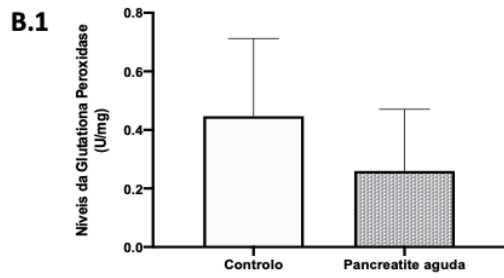
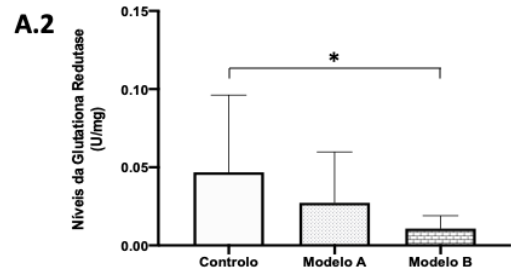
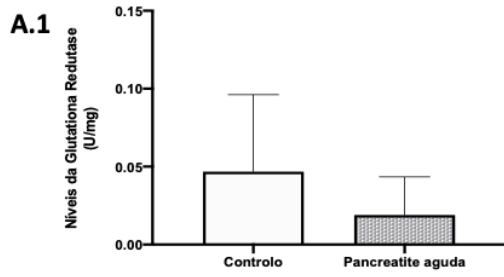
**Tabela 4.4** - Distribuição dos níveis das defesas antioxidantes no grupo controlo e nos modelos murinos de pancreatite aguda. Foram analisados os níveis de glutatona redutase (U/mg), glutatona peroxidase (U/mg), catalase (U/mg), superóxido dismutase (U/mg), vitamina A (mM) e vitamina E (mM). Modelo A: modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum e Modelo B: modelo da laqueação duodenal em ansa fechada. (n=8) Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão.

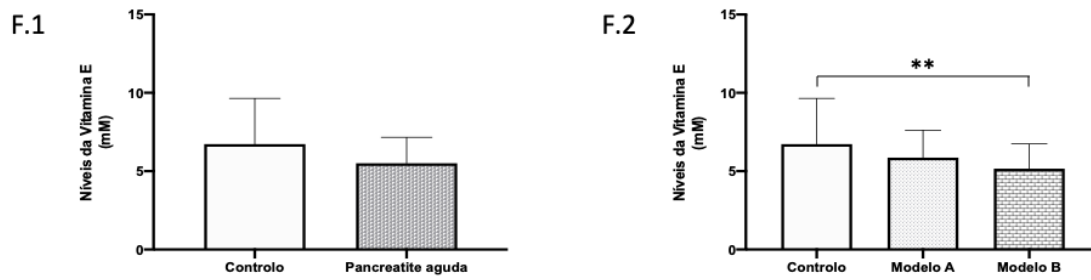
Defesas antioxidantes	Controlo (n=8)	PA (n=16)	Modelo A (n=8)	Modelo B (n=8)
<b>GR</b>	$0.047 \pm 0.050$	$0.019 \pm 0.024$	$0.027 \pm 0.033$	$0.011 \pm 0.008$
<b>GPx</b>	$0.447 \pm 0.265$	$0.260 \pm 0.211$	$0.337 \pm 0.229$	$0.183 \pm 0.171$
<b>CAT</b>	$9978 \pm 2355$	$5477 \pm 3581$	$5786 \pm 5034$	$5168 \pm 1385$
<b>SOD</b>	$3038 \pm 691$	$2955 \pm 1021$	$3150 \pm 767$	$2761 \pm 1248$
<b>Vitamina A</b>	$0.579 \pm 0.16$	$0.363 \pm 0.23$	$0.499 \pm 0.26$	$0.228 \pm 0.08$
<b>Vitamina E</b>	$6.73 \pm 2.91$	$5.51 \pm 1.66$	$5.86 \pm 1.75$	$5.16 \pm 1.59$

CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; PA: pancreatite aguda; SOD: superóxido dismutase.



Pancreatite Aguda: Novas Fronteiras no Prognóstico





**Figura 4.7** - Avaliação dos níveis das defesas antioxidantes nos modelos murinos de pancreatite aguda. **A.1**, Níveis de glutatona redutase (U/mg), **B.1**, Níveis de glutatona peroxidase (U/mg), **C.1**, Níveis de catalase ( $\mu$ moles/min/mL), **D.1**, Níveis de superóxido de dismutase (U/mg), **E.1**, Níveis de vitamina A (mM) e **F.1**, Níveis de vitamina E (mM) em ratos controlos e com pancreatite aguda; **A.2**, Níveis de glutatona redutase (U/mg), **B.2**, Níveis de glutatona peroxidase (U/mg), **C.2**, Níveis de catalase ( $\mu$ moles/min/mL), **D.2**, Níveis de superóxido de dismutase (U/mg), **E.2**, Níveis de vitamina A (mM) e **F.2**, Níveis de vitamina E (mM) no grupo controlo e modelo A: modelo de laqueação do ducto biliopancreático comum e modelo B: modelo da laqueação duodenal em ansa fechada. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. (n=8, por grupo) As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  e \*\* representa  $p < 0.01$  (Teste de Mann-Whitney)

Da análise dos resultados obtidos, expressos na tabela 4.4 e na figura 4.7-A.1 e A.2, verificou-se uma tendência para a diminuição dos níveis de GR entre os animais com PA e o grupo controlo ( $0.019 \pm 0.024$  U/mg vs  $0.047 \pm 0.050$  U/mg;  $p = 0.061$ ) e entre o modelo A e o grupo controlo ( $0.027 \pm 0.033$  U/mg vs  $0.047 \pm 0.050$  U/mg;  $p = 0.279$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Observou-se, no entanto, uma diminuição significativa para o modelo B quando comparado com o grupo controlo ( $0.011 \pm 0.008$  U/mg vs  $0.047 \pm 0.050$  U/mg;  $p = 0.038$ ). Quando se compararam os níveis de GPx, expressos na tabela 4.4 e na figura 4.7-B.1 e B.2, verificou-se, uma tendência para a diminuição da sua atividade entre os animais com PA e o grupo controlo ( $0.260 \pm 0.211$  U/mg vs  $0.447 \pm 0.265$  U/mg;  $p = 0.052$ ) e entre o modelo A e o grupo controlo ( $0.337 \pm 0.229$  U/mg vs  $0.447 \pm 0.265$  U/mg;  $p = 0.234$ ), embora sem significado estatístico. No entanto, constatou-se uma diminuição significativa entre o modelo B e o grupo controlo ( $0.183 \pm 0.171$  U/mg vs  $0.447 \pm 0.265$  U/mg;  $p = 0.030$ ). Através da análise da tabela 4.4 e da figura 4.7-C.1 e C.2 verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de CAT entre os animais com PA e o grupo controlo ( $5477 \pm 3581$   $\mu$ moles/min/mL vs  $9978 \pm 2355$   $\mu$ moles/min/mL;  $p = 0.003$ ), entre o modelo A e o grupo controlo ( $5786 \pm 5034$   $\mu$ moles/min/mL vs  $9978 \pm 2355$   $\mu$ moles/min/mL;  $p = 0.05$ ) e entre o Modelo B e o grupo controlo ( $5168 \pm 1385$   $\mu$ moles/min/mL vs  $9978 \pm 2355$   $\mu$ moles/min/mL;  $p = 0.002$ ). Através da análise da tabela 4.3 e da figura 4.6-D.1 e D.2 verificou-se que não existem alterações significativas de SOD entre os animais com PA e o grupo controlo ( $2955 \pm 1021$  U/mg vs  $3038 \pm 691$  U/mg;  $p = 0.881$ ), e entre cada modelo individual (modelo A:  $3150 \pm 767$  U/mg vs  $3038 \pm 691$  U/mg;  $p = 1$  e Modelo B:  $2761 \pm 1248$  U/mg vs

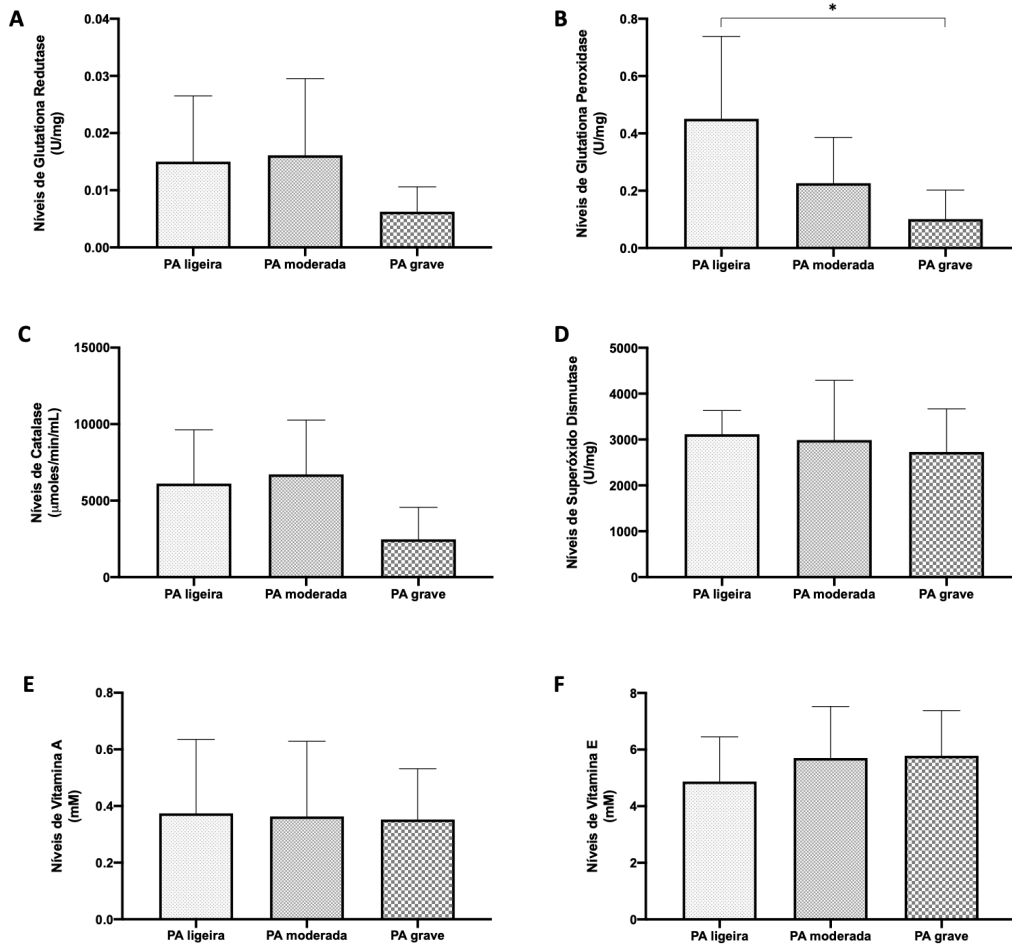
3038±691U/mg: p=0.721). Quando se avaliou a vitamina A, expressa na tabela 4.4 e na figura 4.7-E.1 e E.2, verificou-se uma diminuição significativa dos seus níveis entre os animais com PA e o grupo controlo (0.363±0.23mM vs 0.579±0.16mM: p=0.009). No entanto, quando se analisou cada modelo individualmente verificou-se uma tendência para a sua diminuição do modelo A, embora as diferenças encontradas não cheguem a ser estatisticamente significativas (0.499±0.26mM vs 0.579±0.16mM: p=0.083) e uma diminuição significativa para o modelo B (0.228±0.08mM vs 0.579±0.16mM: p=0.007). Relativamente aos níveis da vitamina E no processo inflamatório pancreático, expressos na tabela 4.4 e na figura 4.7-F.1 e F.2, verificou-se uma tendência para a diminuição dos seus níveis entre os animais com PA e o grupo controlo, embora sem diferenças estatisticamente significativas (5.51±1.66mM vs 6.73±2.91mM: p=0.153). Quando se analisou cada modelo individualmente observou-se uma tendência para a diminuição dos seus níveis no modelo A, sem significado estatístico (5.86±1.75mM vs 6.73±2.91mM: p=0.878) e uma diminuição significativa entre o modelo B e o grupo controlo (5.16±1.59mM vs 6.73±2.91mM: p=0.007).

A comparação entre os níveis das defesas antioxidantes e o *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de PA, encontra-se expressa na tabela 4.5 e na figura 4.8.

**Tabela 4.5** – Distribuição dos níveis das defesas antioxidantes no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda. Foram analisados os níveis de glutathiona redutase (U/mg), glutathiona peroxidase (U/mg), catalase (U/mg), superóxido dismutase (U/mg), vitamina A (mM) e vitamina E (mM). Os valores representam a média ± desvio padrão.

<b>Defesas antioxidantes</b>	<b>PA ligeira (n=4)</b>	<b>PA moderada (n=8)</b>	<b>PA grave (n=4)</b>
<b>GR</b>	0.015±0.012	0.016±0.013	0.048±0.137
<b>GPx</b>	0.451±0.287	0.160±0.053	0.137±0.085
<b>CAT</b>	6230±3533	6604±3650	2472±2090
<b>SOD</b>	3115±516	2988±1302	2730±940
<b>Vitamina A</b>	0.374±0.26	0.363±0.27	0.352±0.18
<b>Vitamina E</b>	4.87±1.58	5.69±1.84	5.78±1.60

CAT: catalase; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; PA: pancreatite aguda; SOD: superóxido dismutase.



**Figura 4.8** - Avaliação dos níveis das defesas antioxidantes no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda. **A**, Níveis de glutathiona redutase (U/mg), **B**, Níveis de glutathiona peroxidase (U/mg), **C**, Níveis de catalase ( $\mu$ moles/min/mL), **D**, Níveis de superóxido dismutase (U/mg), **E**, Níveis de vitamina A (mM) e **F**, Níveis de vitamina E (mM). Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. PA ligeira (n=4), PA moderada (n=8) e PA grave (n=4). As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  (ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher).

Os resultados expressos na tabela 4.5 e na figura 4.8-A, revelaram uma tendência para a diminuição dos níveis de GR entre a PA ligeira e a grave, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $0.015 \pm 0.012$  U/mg *vs*  $0.048 \pm 0.137$  U/mg:  $p=0.460$ ) e entre a PA moderada e a grave ( $0.016 \pm 0.013$  U/mg *vs*  $0.048 \pm 0.137$  U/mg:  $p=0.434$ ), não se observando alterações na expressão da GR entre a PA ligeira e moderada ( $0.015 \pm 0.012$  U/mg *vs*  $0.016 \pm 0.013$  U/mg:  $p=0.944$ ). Quando se compararam os níveis de GPx, expressos na tabela 4.5 e na figura 4.8-B, verificou-se uma diminuição significativa da sua expressão entre a PA ligeira e a grave ( $0.451 \pm 0.287$  U/mg *vs*  $0.137 \pm 0.085$  U/mg:  $p=0.033$ ), tendo-se verificado uma tendência para a diminuição dos seus níveis entre a PA ligeira e a moderada ( $0.451 \pm 0.287$  U/mg *vs*  $0.160 \pm 0.053$  U/mg:  $p=0.070$ ) e entre a PA moderada e a grave ( $0.160 \pm 0.053$  U/mg *vs*  $0.137 \pm 0.085$  U/mg:

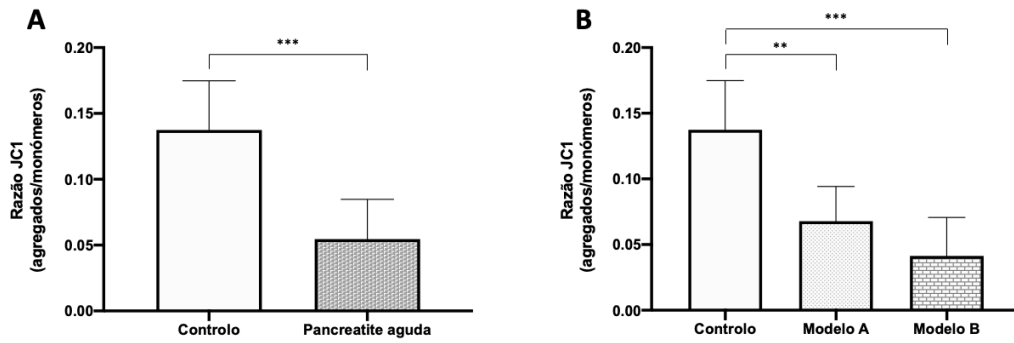
$p=0.448$ ), embora sem significado estatístico. Através da análise dos níveis de CAT, expressa na tabela 4.5 e na figura 4.8-C, verificou-se uma tendência para a diminuição dos níveis entre a PA ligeira e a grave, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $6230 \pm 3533 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$  vs  $2472 \pm 2090 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ :  $p=0.134$ ) e entre a PA moderada e a grave ( $6604 \pm 3650 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$  vs  $2472 \pm 2090 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ :  $p=0.063$ ), não se observando alterações com significado estatístico entre a PA ligeira e a moderada ( $6230 \pm 3533 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$  vs  $6604 \pm 3650 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ :  $p=0.857$ ). Quando se analisaram os níveis de SOD, representados na tabela 4.5 e na figura 4.8-D não se verificaram alterações significativas quando analisados os três grupos em estudo ( $3115 \pm 516 \text{U}/\text{mg}$  vs  $2988 \pm 1302 \text{U}/\text{mg}$ :  $p=0.851$ , para a PA ligeira e a moderada;  $3115 \pm 516 \text{U}/\text{mg}$  vs  $2730 \pm 940 \text{U}/\text{mg}$ :  $p=0.704$ , para a PA ligeira e a grave;  $2988 \pm 1302 \text{U}/\text{mg}$  vs  $2730 \pm 940 \text{U}/\text{mg}$ :  $p=0.624$ , para a PA moderada e a grave). Na avaliação da vitamina A, expressa na tabela 4.5 e na figura 4.8-, também não se verificaram alterações significativas quando analisados os grupos em estudo ( $0.374 \pm 0.26 \text{mM}$  vs  $0.363 \pm 0.27 \text{mM}$ :  $p=0.664$ , para a PA ligeira e a moderada;  $0.374 \pm 0.26 \text{mM}$  vs  $0.352 \pm 0.18 \text{mM}$ :  $p=0.375$ , para a PA ligeira e a grave;  $0.363 \pm 0.27 \text{mM}$  vs  $0.352 \pm 0.18 \text{mM}$ :  $p=0.548$ , para a PA moderada e a grave). Relativamente à vitamina E, representada na tabela 4.5 e na figura 4.7-F, verificou-se uma tendência para o aumento dos seus níveis entre PA ligeira e a moderada ( $4.87 \pm 1.58 \text{mM}$  vs  $5.69 \pm 1.84 \text{mM}$ :  $p=0.667$ ) e entre a PA ligeira e grave ( $4.87 \pm 1.58 \text{mM}$  vs  $5.78 \pm 1.60 \text{mM}$ :  $p=0.299$ ), embora sem significado estatístico, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre a PA moderada e a grave ( $5.69 \pm 1.84 \text{mM}$  vs  $5.78 \pm 1.60 \text{mM}$ :  $p=0.577$ ).

#### 4.1.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Na avaliação do papel da disfunção mitocondrial na PA, refletida no PMM, recorreu-se à razão JC1 agregados/monómeros. Esta razão foi calculada para cada condição como uma medida funcional mitocondrial. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 4.6 e na figura 4.9.

**Tabela 4.6** - Distribuição do potencial de membrana mitocondrial no grupo controlo e nos modelos murinos de pancreatite aguda. Modelo A: modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum e Modelo B: modelo da laqueação duodenal em ansa fechada. Medição realizada pela sonda fluorescente JC1. (n=8) Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão.

PMM	Controlo (n=8)	PA (n=16)	Modelo A (n=8)	Modelo B (n=8)
<b>Razão JC1</b>	0.137 $\pm$ 0.037	0.055 $\pm$ 0.030	0.068 $\pm$ 0.026	0.041 $\pm$ 0.029



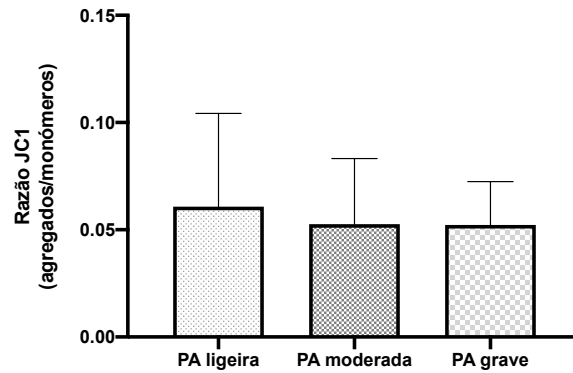
**Figura 4.9** - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nos modelos murinos de pancreatite aguda. **A**, Comparação entre o grupo controlo e modelos murinos com pancreatite aguda; **B**, Comparação entre o grupo controlo e modelo A (modelo de laqueação do ducto biliopancreático comum) e modelo B (modelo da laqueação duodenal em ansa fechada). Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pela sonda fluorescente JC1, através da razão JC1 agregados (mitocôndrias funcionais)/monómeros (mitocôndrias disfuncionais). (n=8, por grupo) As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \*\* representa  $p < 0.01$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (Teste de Mann-Whitney)

A cadeia de transporte de eletrões mitocondrial é um dos principais geradores celulares de ROS. Quando a razão JC1 foi analisada entre o grupo controlo e a indução de PA verificou-se uma diminuição significativa na razão entre os agregados e monómeros no grupo com PA ( $0.137 \pm 0.037$  vs  $0.055 \pm 0.030$ ;  $p < 0.001$ ), representada na tabela 4.6 e na figura 4.9-A. Quando se analisou cada modelo individualmente, representado na tabela 4.6 e na figura 4.-B, verificou-se igualmente uma diminuição significativa na razão agregados e monómeros entre o grupo controlo e o modelo A ( $0.137 \pm 0.037$  vs  $0.068 \pm 0.026$ ;  $p = 0.002$ ) e modelo B ( $0.137 \pm 0.037$  vs  $0.041 \pm 0.029$ ;  $p < 0.001$ ).

Posteriormente, a disfunção mitocondrial foi avaliada no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de PA, representada na tabela 4.7 e na figura 4.10.

**Tabela 4.7** - Distribuição do potencial de membrana mitocondrial no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição pela sonda fluorescente JC1.

PMM	PA ligeira (n=4)	PA moderada (n=8)	PA grave (n=4)
<b>Razão JC1</b>	0.061 $\pm$ 0.043	0.053 $\pm$ 0.031	0.052 $\pm$ 0.020



**Figura 4.10** - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial no *score* histológico de gravidade nos modelos murinos de pancreatite aguda. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição pela sonda fluorescente JC1, através da razão JC1 agregados (mitocôndrias funcionais)/monómeros (mitocôndrias disfuncionais). PA ligeira (n=4), PA moderada (n=8) e PA grave (n=4). (ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher)

Verificou-se, pela análise da tabela 4.7 e da figura 4.10, que a razão agregados e monómeros apresentou uma tendência para a diminuição entre a PA ligeira e a moderada ( $0.061 \pm 0.043$  vs  $0.053 \pm 0.031$ ;  $p=0.687$ ) e entre a PA ligeira e a grave ( $0.061 \pm 0.043$  vs  $0.052 \pm 0.020$ ;  $p=0.715$ ) embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Não se verificaram alterações entre a PA moderada e a grave ( $0.053 \pm 0.031$  vs  $0.052 \pm 0.020$ ;  $p=0.985$ ).

## **4.2. Estudo Clínico**

### **4.2.1. Caracterização demográfica e clínica**

Da amostra inicial de 117 doentes com PA, foram incluídos no presente estudo, após a aplicação dos critérios de exclusão, 75 doentes com PA litiásica. Segundo a RAC, 47 doentes tiveram PA ligeira, 15 moderadamente grave e 13 PA grave. Esta amostra foi usada na avaliação dos marcadores serológicos e *scores* multifatoriais de gravidade da PA.

Na avaliação do SO foram incluídos os primeiros 15 doentes com PA ligeira, os primeiros 15 doentes com PA moderadamente grave, os 13 doentes com PA e 15 indivíduos saudáveis para o grupo controlo.

Na análise do perfil metabólico foi utilizada a amostra descrita para o SO, no entanto, devido à má qualidade de algumas mostras para a aplicação da técnica de <sup>1</sup>H-RMN, a amostra incluída foi constituída por 10 doentes com PA ligeira, 9 doentes com PA moderadamente grave, 10 doentes com PA grave e 11 indivíduos saudáveis para o grupo controlo.

No início de cada subcapítulo serão apresentadas as características sociodemográficas e clínicas de cada amostra em estudo.

### **4.2.2. Avaliação dos marcadores serológicos e *scores* multifatoriais de gravidade**

Foram incluídos, para a avaliação dos marcadores serológicos e dos *scores* multifatoriais de gravidade, 75 doentes com PA litiásica. Segundo a RAC, 47 doentes tiveram PA ligeira, 15 moderadamente grave e 13 PA grave. As características sócio-demográficas e clínicas dos doentes encontram-se expressas na tabela 4.8. A idade média dos doentes com PA litiásica foi de 72 anos (24-96 anos) e com uma razão de sexo feminino:masculino de 1.34:1 (43/32). As comorbilidades *major* dos doentes com PA incluíram doença cardiovascular, insuficiência renal crónica e diabetes *mellitus*. A taxa de mortalidade foi de 6.7% (5/75). Não se verificaram alterações com significado estatístico entre a RAC e a idade ( $p=0.767$ ), sexo ( $p=0.777$ ), índice de massa corporal (IMC) ( $p=0.944$ ) e índice de Charlson ( $p=0.644$ ).



**Tabela 4.8** - Dados sociodemográficos e clínicos dos doentes com pancreatite aguda litiásica internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB. Resultados expressos em média ± desvio padrão, mediana (percentil:25-percentil:75) ou n (%).

	Tempo	PA (n=75)	PA ligeira (n=47)	PA moderadamente grave (n=15)	PA grave (n=13)
<b>Idade</b>	-	72 ± 17.4	70 ± 18.7	73 ± 14.1	74 ± 17.1
<b>Sexo feminino</b>	-	57.3%	26 (55.3%)	10 (66.7%)	7 (53.8%)
<b>IMC ≥ 30</b>	-	18.6%	9 (19.1%)	3 (20%)	2 (15.4%)
<b>Charlson Índice</b>	-	3 (2-4)	3 (1-4)	3 (2-4)	3 (2-4)
<b>Hospitalização</b>	-	8 (6-12)	7 (6-9)	11 (7-15)	18 (11-24)
<b>Mortalidade</b>	-	5 (6.7%)	-	-	5 (38.4%)
<b>Amilase</b>	admissão	1561 ± 1316	1435 ± 1306	1709 ± 1360	1847 ± 1343
	48 horas	224 ± 196	173 ± 143	290 ± 278	330 ± 197
<b>Lipase</b>	admissão	16364 ± 17118	15612 ± 16832	19282 ± 21145	15720 ± 13640
	48 horas	1133 ± 1241	1028 ± 1209	1144 ± 840	1491 ± 1701
<b>Leucócitos</b>	admissão	13.56 ± 4.89	12.21 ± 4.31	13.89 ± 5.11	18.31 ± 3.89
	48 horas	10.09 ± 5.33	8.08 ± 3.57	12.95 ± 7.58	13.91 ± 4.03
<b>Neutrófilos</b>	admissão	11.40 ± 4.83	9.89 ± 4.28	12.03 ± 4.76	16.39 ± 3.39
	48 horas	7.91 ± 5.38	5.58 ± 3.63	10.91 ± 7.07	13.07 ± 2.77
<b>NLR</b>	admissão	12.36 ± 8.60	10.49 ± 8.78	12.40 ± 5.57	19.47 ± 7.72
	48 horas	8.27 ± 7.48	5.43 ± 6.02	10.01 ± 5.44	16.51 ± 7.89
<b>SIRI</b>	admissão	9.09 ± 10.49	9.15 ± 12.35	7.59 ± 5.98	10.61 ± 6.85
	48 horas	4.63 ± 4.91	2.60 ± 2.70	6.40 ± 6.17	10.21 ± 4.91
<b>PLR</b>	admissão	228.0 ± 139.2	210.6 ± 144.0	222.5 ± 105.8	297.6 ± 143.2
	48 horas	172.1 ± 97.4	150.1 ± 82.1	180.0 ± 72.6	240.7 ± 138.9
<b>BUN</b>	admissão	22.25 ± 9.82	19.77 ± 7.83	22.40 ± 8.88	30.86 ± 12.66
	48 horas	19.27 ± 14.14	14.12 ± 6.39	18.48 ± 8.56	43.81 ± 21.75
<b>Creatinina</b>	admissão	0.91 ± 0.40	0.84 ± 0.26	0.84 ± 0.31	1.25 ± 0.65
	48 horas	0.91 ± 0.50	0.79 ± 0.27	0.77 ± 0.37	1.48 ± 0.79
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	admissão	8.99 ± 0.64	8.95 ± 0.53	9.03 ± 0.64	9.08 ± 0.99
	48 horas	8.62 ± 0.71	8.82 ± 0.51	8.53 ± 0.56	7.94 ± 1.08
<b>LDH</b>	admissão	1064 ± 911	1000 ± 1010	1286 ± 892	1021 ± 517
	48 horas	698 ± 785	465 ± 128	575 ± 432	1666 ± 1493
<b>Proteínas totais</b>	admissão	6.5 ± 0.6	6.6 ± 0.6	6.5 ± 0.5	6.2 ± 0.5
	48 horas	5.9 ± 0.7	6.2 ± 0.5	5.8 ± 0.5	5.1 ± 0.7
<b>Albumina</b>	admissão	3.56 ± 0.45	3.57 ± 0.47	3.64 ± 0.32	3.43 ± 0.50
	48 horas	3.05 ± 0.52	3.23 ± 0.43	2.93 ± 0.39	2.55 ± 0.60
<b>PCT</b>	admissão	3.23 ± 6.56	2.57 ± 6.18	3.52 ± 4.83	5.27 ± 9.23
	48 horas	3.17 ± 5.71	1.76 ± 3.73	3.76 ± 6.65	7.57 ± 8.16
<b>PCR</b>	admissão	53.39 ± 87.61	40.83 ± 67.97	39.02 ± 56.88	115.39 ± 144.24
	48 horas	160.42 ± 134.31	99.44 ± 99.37	208.49 ± 111.37	325.45 ± 109.34
<b>Hepcidina*</b>	admissão	73.16 ± 79.72	52.21 ± 72.28	85.83 ± 57.90	120.88 ± 98.12
	48 horas	93.97 ± 101.75	46.91 ± 41.07	74.42 ± 50.78	275.98 ± 85.92
<b>BISAP</b>	admissão	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-3)	2 (1-3)
	48 horas	1 (1-3)	1 (1-2)	2 (1-3)	4 (4-5)
<b>SIRS</b>	admissão	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)	1 (1-2)
	48 horas	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	3 (2-3)
<b>MMS</b>	admissão	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	1 (0-3)
	48 horas	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-2)	3 (2-4)

BISAP: *Bedside Index for Severity of Acute Pancreatitis*; BUN: *blood urea nitrogen*; Ca<sup>2+</sup>: cálcio; IMC: Índice de massa corporal; LDH: *lactate dehydrogenase*; MMS: *modified Marshall score*; NLR: *Neutrophil-lymphocyte ratio*; PA: pancreatite aguda; PCR: proteína C-reativa; PCT: procalcitonina; PLR: *Platelet-lymphocyte ratio*; SIRI: *Systemic Inflammatory Response Index*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

\* Na avaliação da hepcidina foram analisadas 66 amostras de soro de doentes com PA: ligeira (n=41), moderadamente grave (n=13) e grave (n=12)

Na tabela 4.8 foram incluídos e avaliados, na admissão e às 48 horas após o início dos sintomas, vários marcadores serológicos e *scores* multifatoriais. Os marcadores serológicos analisados foram a amilase, lipase, leucócitos, neutrófilos, NLR, SIRI, PLR, BUN, creatinina, Ca<sup>2+</sup>, LDH, proteínas totais, albumina, PCT, PCR e hepcidina. Os *scores* multifatoriais estudados foram o BISAP, SIRS e MMS. No sentido de melhor esquematizar os resultados obtidos, primeiramente avaliou-se os marcadores serológicos e posteriormente os *scores* multifatoriais.

Neste sentido, foi efetuada a comparação de cada marcador com a RAC, encontrando-se os resultados expressos na tabela 4.9.

**Tabela 4.9** - Avaliação dos marcadores serológicos dos doentes com pancreatite aguda litiásica e a sua relação com a RAC na admissão e às 48 horas de início dos sintomas. (teste de Kruskal-Wallis).

	RAC	
	Admissão ( <i>p</i> )	48 horas ( <i>p</i> )
<b>Amilase</b>	NS	0.017
<b>Lipase</b>	NS	NS
<b>Leucócitos</b>	0.001	<0.001
<b>Neutrófilos</b>	<0.001	<0.001
<b>NLR</b>	0.003	<0.001
<b>SIRI</b>	NS	<0.001
<b>PLR</b>	NS	0.017
<b>BUN</b>	0.002	<0.001
<b>Creatinina</b>	NS	0.002
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	NS	0.008
<b>LDH</b>	NS	0.002
<b>Proteínas totais</b>	NS	<0.001
<b>Albumina</b>	NS	<0.001
<b>PCT</b>	0.013	0.001
<b>PCR</b>	NS	<0.001
<b>Hepcidina</b>	0.013	<0.001

BUN: *blood urea nitrogen*; Ca<sup>2+</sup>: cálcio; LDH: *lactate dehidrogenase*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; NS: *not significant*; PCR: proteína C-reativa; PCT: procalcitonina; PLR: *platelet-lymphocyte ratio*; RAC: *Revised Atlanta classification*; SIRI: *Systemic Inflammatory Response Index*.

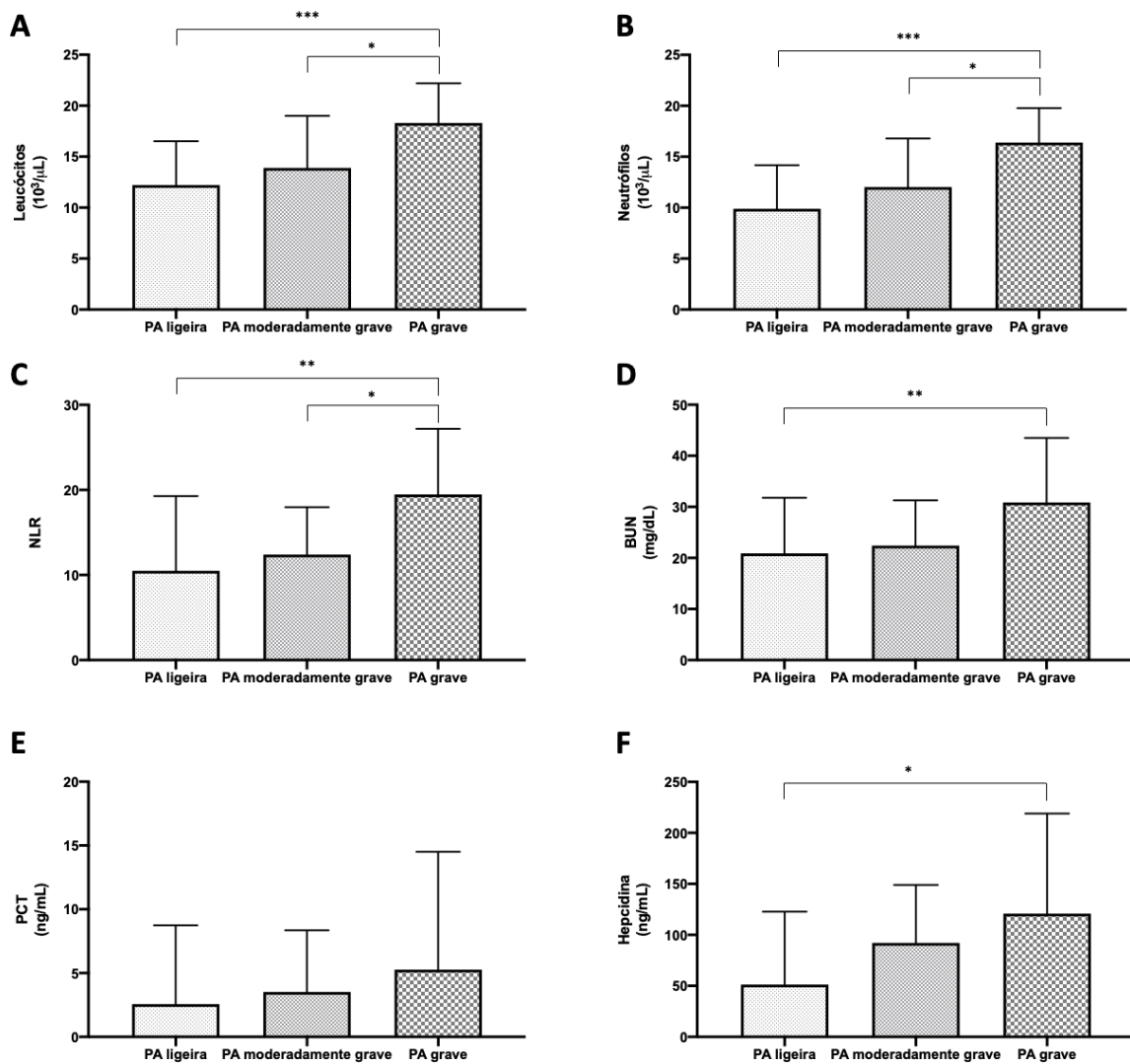
Os resultados expressos na tabela 4.8, onde se observam os valores de cada marcador segundo a RAC e na tabela 4.9 que apresenta o *p-value* de cada marcador em relação à classificação em estudo, revelaram que, na admissão os leucócitos ( $12.21 \pm 4.31 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $13.89 \pm 5.11 \times 10^3/\mu\text{L}$  e  $18.31 \pm 3.89 \times 10^3/\mu\text{L}$ :  $p=0.001$ ), neutrófilos

( $9.89 \pm 4.28 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $12.03 \pm 4.76 \times 10^3/\mu\text{L}$  e  $16.39 \pm 3.39 \times 10^3/\mu\text{L}$ :  $p < 0.001$ ), NLR ( $10.49 \pm 8.78$ ,  $12.40 \pm 5.57$  e  $19.47 \pm 7.72$ :  $p = 0.003$ ), BUN ( $19.77 \pm 7.83 \text{mg/dL}$ ,  $22.40 \pm 8.88 \text{mg/dL}$  e  $30.86 \pm 12.66 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.002$ ), PCT ( $2.57 \pm 6.18 \text{ng/mL}$ ,  $3.52 \pm 4.83 \text{ng/mL}$  e  $5.27 \pm 9.23 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.013$ ) e hepcidina ( $52.21 \pm 72.28 \text{ng/mL}$ ,  $85.83 \pm 57.90 \text{ng/mL}$  e  $120.88 \pm 98.12 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.013$ ) apresentaram alterações significativas com a RAC. Por sua vez, a amilase ( $p = 0.425$ ), lipase ( $p = 0.880$ ), SIRI ( $p = 0.083$ ), PLR ( $p = 0.218$ ), creatinina ( $p = 0.182$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p = 0.896$ ), LDH ( $p = 0.165$ ), proteínas totais ( $p = 0.254$ ), albumina ( $p = 0.322$ ) e PCR ( $p = 0.571$ ) não apresentaram alterações significativas quando comparadas com a RAC.

Relativamente às 48 horas, observou-se que a amilase ( $173 \pm 143 \text{U/L}$ ,  $290 \pm 278 \text{U/L}$  e  $330 \pm 197 \text{U/L}$ :  $p = 0.017$ ), leucócitos ( $8.08 \pm 3.57 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $12.95 \pm 7.58 \times 10^3/\mu\text{L}$  e  $13.91 \pm 4.03 \times 10^3/\mu\text{L}$ :  $p < 0.001$ ), neutrófilos ( $5.58 \pm 3.63 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $10.91 \pm 7.07 \times 10^3/\mu\text{L}$  e  $13.07 \pm 2.77 \times 10^3/\mu\text{L}$ :  $p < 0.001$ ), NLR ( $5.43 \pm 6.02$ ,  $10.01 \pm 5.44$  e  $16.51 \pm 7.89$ :  $p < 0.001$ ), SIRI ( $2.60 \pm 2.70$ ,  $6.40 \pm 6.17$  e  $10.21 \pm 4.91$ :  $p < 0.001$ ), PLR ( $150.1 \pm 82.1$ ,  $180.0 \pm 72.6$  e  $240.7 \pm 138.9$ :  $p = 0.017$ ), BUN ( $14.12 \pm 6.39 \text{mg/dL}$ ,  $18.48 \pm 8.56 \text{mg/dL}$  e  $43.81 \pm 21.75 \text{mg/dL}$ :  $p < 0.001$ ), creatinina ( $0.79 \pm 0.27 \text{mg/dL}$ ,  $0.77 \pm 0.37 \text{mg/dL}$  e  $1.48 \pm 0.79 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.002$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $8.82 \pm 0.51 \text{mg/dL}$ ,  $8.53 \pm 0.56 \text{mg/dL}$  e  $7.94 \pm 1.08 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.008$ ), LDH ( $465 \pm 128 \text{U/L}$ ,  $575 \pm 432 \text{U/L}$  e  $1666 \pm 1493 \text{U/L}$ :  $p = 0.002$ ), proteínas totais ( $6.2 \pm 0.5 \text{g/dL}$ ,  $5.8 \pm 0.5 \text{g/dL}$  e  $5.1 \pm 0.7 \text{g/dL}$ :  $p < 0.001$ ), albumina ( $3.23 \pm 0.43 \text{g/dL}$ ,  $2.93 \pm 0.39 \text{g/dL}$  e  $2.55 \pm 0.60 \text{g/dL}$ :  $p < 0.001$ ), PCT ( $1.76 \pm 3.73 \text{ng/mL}$ ,  $3.76 \pm 6.65 \text{ng/mL}$  e  $7.57 \pm 8.16 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.001$ ), PCR ( $99.44 \pm 99.37 \text{mg/mL}$ ,  $208.49 \pm 111.37 \text{mg/mL}$  e  $325.45 \pm 109.34 \text{mg/mL}$ :  $p < 0.001$ ) e hepcidina ( $46.91 \pm 41.07 \text{ng/mL}$ ,  $74.42 \pm 50.78 \text{ng/mL}$  e  $275.98 \pm 85.92 \text{ng/mL}$ :  $p < 0.001$ ) apresentaram alterações significativas em relação à RAC. Por sua vez, a lipase ( $p = 0.371$ ) não apresentou alterações significativas quando comparada com a RAC.

Após a identificação dos marcadores serológicos que apresentaram alterações com significado estatístico com a RAC, procedeu-se a uma análise entre eles e os graus de gravidade definidos pela RAC [9]: PA ligeira, PA moderadamente grave e PA grave.

Na figura 4.11 estão representados os níveis dos marcadores serológicos colhidos na admissão dos doentes.



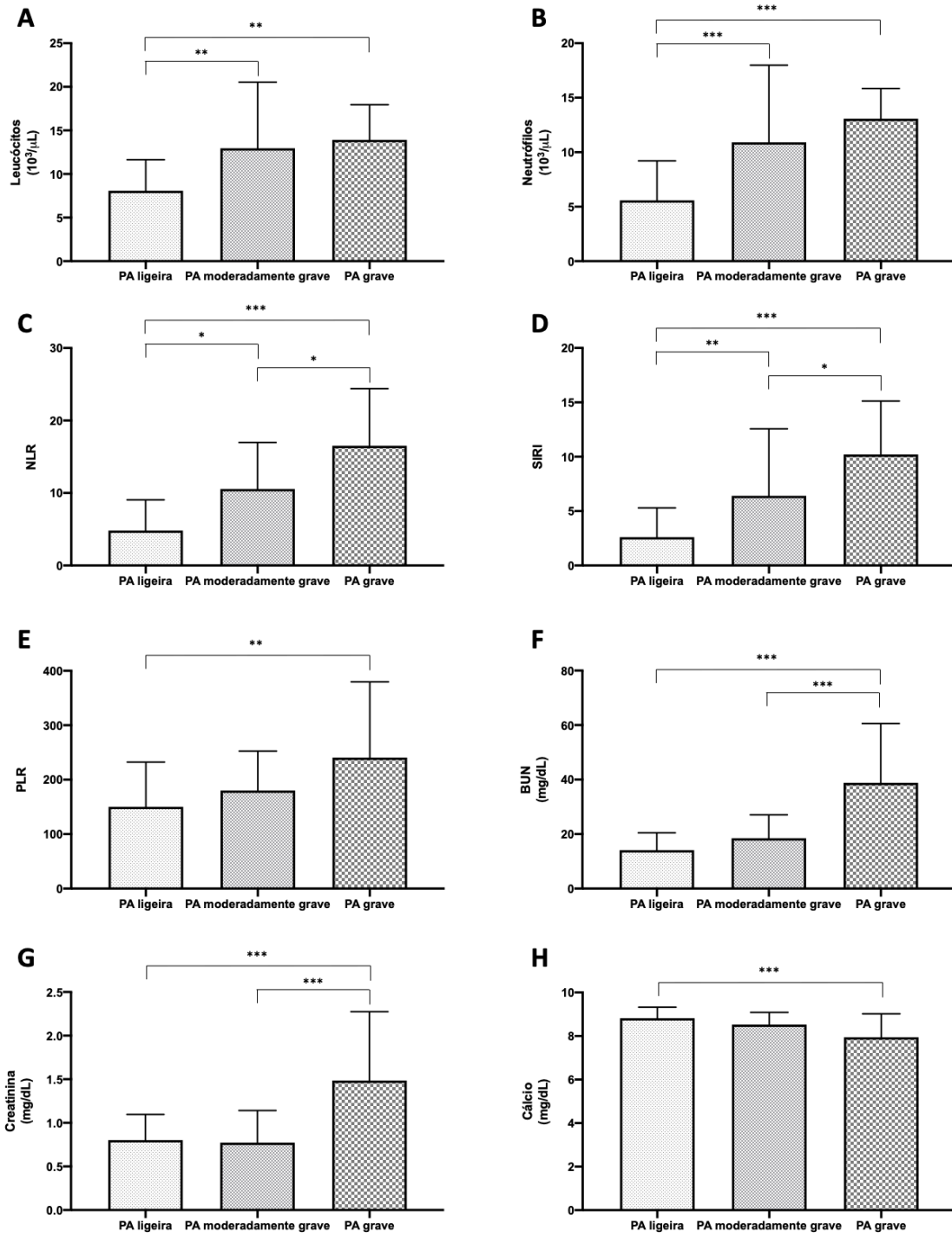
**Figura 4.11** – Avaliação dos níveis dos marcadores serológicos nos doentes com pancreatite aguda litíásica e a sua relação com a RAC na admissão. **A**, níveis de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); **B**, níveis de neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); **C**, níveis de BUN (mg/dL); **D**, níveis de NLR; **E**, níveis de PCT (ng/mL); **F**, níveis de hepcidina (ng/mL). BUN: *blood urea nitrogen*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; PCT: *procalcitonina*. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$ , \*\* representa  $p < 0.01$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher)

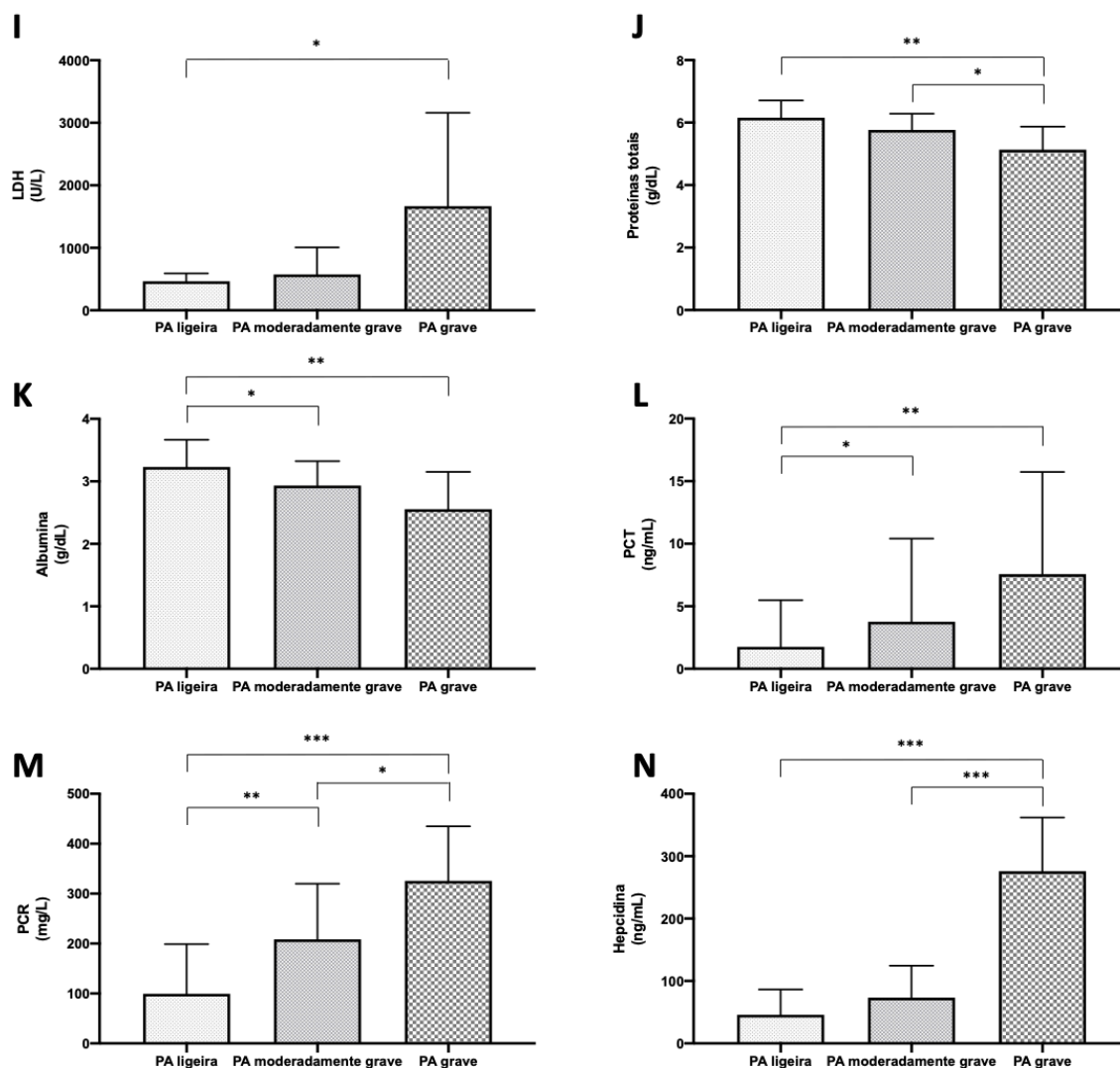
Os dados obtidos na admissão, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.11-A, mostraram um aumento significativo dos níveis dos leucócitos entre a PA ligeira e a grave ( $12.21 \pm 4.31 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $18.31 \pm 3.89 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p < 0.001$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $13.89 \pm 5.11 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $18.31 \pm 3.89 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p = 0.044$ ), tendo-se observado, entre a PA ligeira e moderadamente grave uma tendência para o aumento dos seus níveis, embora sem significado estatístico ( $12.21 \pm 4.31 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $13.89 \pm 5.11 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p = 0.215$ ). Quando se compararam os níveis dos neutrófilos, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.11-B, verificou-se um aumento significativo dos seus níveis entre a PA ligeira e a grave ( $9.89 \pm 4.28 \times 10^3/\mu\text{L}$

vs  $16.39 \pm 3.39 \times 10^3 / \mu\text{L}$ :  $p < 0.001$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $12.03 \pm 4.78 \times 10^3 / \mu\text{L}$  vs  $16.39 \pm 3.39 \times 10^3 / \mu\text{L}$ :  $p = 0.027$ ). Observou-se uma tendência para o aumento dos níveis entre a PA ligeira e moderadamente grave, embora sem significado estatístico ( $9.89 \pm 4.28 \times 10^3 / \mu\text{L}$  vs  $12.03 \pm 4.76 \times 10^3 / \mu\text{L}$ :  $p = 0.288$ ). Quando se analisaram os níveis de NLR, representados na tabela 4.8 e na figura 4.11-C, observou-se um aumento significativo dos seus níveis entre a PA ligeira e a grave ( $10.49 \pm 8.78$  vs  $19.47 \pm 7.72$ :  $p = 0.007$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $12.40 \pm 5.57$  vs  $19.47 \pm 7.72$ :  $p = 0.038$ ). Por sua vez, entre a PA ligeira e moderadamente grave verificou-se uma tendência para o aumento dos níveis de NLR, sem significado estatístico ( $10.49 \pm 8.78$  vs  $12.40 \pm 5.57$ :  $p = 0.588$ ). Através da análise dos níveis de BUN, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.11-D, verificou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e a grave ( $19.77 \pm 7.83 \text{mg/dL}$  vs  $30.86 \pm 12.66 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.023$ ). Entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $19.77 \pm 7.83 \text{mg/dL}$  vs  $22.40 \pm 8.88 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.570$ ) e PA moderadamente grave e grave ( $22.40 \pm 8.88 \text{mg/dL}$  vs  $30.86 \pm 12.66 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.132$ ) observou-se uma tendência para o aumento dos níveis de BUN, embora sem significado estatístico. Quando foram analisados os níveis de PCT nos três graus de gravidade da PA, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.11-E, verificou-se uma tendência para o aumento dos níveis para as formas mais graves, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $2.57 \pm 6.18 \text{ng/mL}$  vs  $3.52 \pm 4.83 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.809$ , entre a PA ligeira e moderadamente grave;  $2.57 \pm 6.18 \text{ng/mL}$  vs  $5.27 \pm 9.23 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.589$ , entre a PA ligeira e grave;  $3.52 \pm 4.83 \text{ng/mL}$  vs  $5.27 \pm 9.23 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.814$ , entre a PA moderadamente grave e grave). Quando se analisou os níveis de hepcidina, representados na tabela 4.8 e na figura 4.11-F, observou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e grave ( $52.21 \pm 72.28 \text{ng/mL}$  vs  $120.88 \pm 98.12 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.009$ ) e uma tendência para o aumento dos seus níveis entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $52.21 \pm 72.28 \text{ng/mL}$  vs  $85.83 \pm 57.90 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.208$ ) e entre a PA moderadamente grave e grave ( $85.83 \pm 57.90 \text{ng/mL}$  vs  $120.88 \pm 98.12 \text{ng/mL}$ :  $p = 0.274$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas.

Na figura 4.12 são expressos os níveis dos marcadores serológicos colhidos após 48 horas do início dos sintomas.

Pancreatite Aguda: Novas Fronteiras no Prognóstico





**Figura 4.12** - Avaliação dos níveis dos marcadores serológicos nos doentes com pancreatite aguda litíásica e a sua relação com a RAC, às 48 horas de início dos sintomas. **A**, níveis de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); **B**, níveis de neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); **C**, níveis de NLR; **D**, níveis de SIRI; **E**, níveis de PLR; **F**, níveis de BUN (mg/dL); **G**, níveis de creatinina (mg/dL); **H**, níveis de cálcio (mg/dL); **I**, níveis de LDH (U/L); **J**, níveis de proteínas totais (g/dL); **K**, níveis de albumina (g/dL); **L**, níveis de PCT (ng/mL); **M**, níveis de PCR (mg/mL); **N**, níveis de hepcidina (ng/mL). BUN: *blood urea nitrogen*; LDH: *lactate dehidrogenase*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; PA: pancreatite aguda; PCR: proteína C-reativa; PCT: procalcitonina; PLR: *platelet-lymphocyte ratio*; SIRI: *Systemic Inflammatory Response Index*. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$ , \*\* representa  $p < 0.01$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher).

A análise dos dados às 48 horas após o início dos sintomas, representados na tabela 4.8 e na figura 4.12-A, demonstrou um aumento significativo dos níveis dos leucócitos entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $8.08 \pm 3.57 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $12.95 \pm 7.58 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p = 0.002$ ), entre a PA ligeira e a grave ( $8.08 \pm 3.57 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $13.91 \pm 4.03 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p = 0.001$ ), não se verificando diferenças entre a PA moderadamente grave e a grave ( $12.95 \pm 7.58 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs  $13.91 \pm 4.03 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p = 0.853$ ). Quando se compararam os níveis dos neutrófilos, expressos

na tabela 4.8 e na figura 4.12-B, verificou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $5.58 \pm 3.63 \times 10^3 / \mu\text{L}$  vs  $10.91 \pm 7.07 \times 10^3 / \mu\text{L}$ :  $p < 0.001$ ), entre a PA ligeira e a grave ( $5.58 \pm 3.63 \times 10^3 / \mu\text{L}$  vs  $13.07 \pm 2.77 \times 10^3 / \mu\text{L}$ :  $p < 0.001$ ), observando-se uma tendência para o aumento entre a PA moderadamente grave e a grave, embora sem significado estatístico ( $10.91 \pm 7.07 \times 10^3 / \mu\text{L}$  vs  $13.07 \pm 2.77 \times 10^3 / \mu\text{L}$ :  $p = 0.426$ ). Através da análise dos níveis de NLR, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-C, observou-se um aumento significativo entre os diferentes graus de PA ( $5.43 \pm 6.02$  vs  $10.01 \pm 5.44$ :  $p = 0.042$ , entre a PA ligeira e moderadamente grave;  $5.43 \pm 6.02$  vs  $16.51 \pm 7.89$ :  $p < 0.001$ , entre a PA ligeira e grave;  $10.01 \pm 5.44$  vs  $16.51 \pm 7.89$ :  $p = 0.021$ , entre a PA moderadamente grave e grave). Quando se analisaram os níveis de SIRI, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-D, verificou-se, também, um aumento significativo entre os diferentes graus de PA ( $2.60 \pm 2.70$  vs  $6.40 \pm 6.17$ :  $p = 0.006$ , entre a PA ligeira e moderadamente grave;  $2.60 \pm 2.70$  vs  $10.21 \pm 4.91$ :  $p < 0.001$ , entre a PA ligeira e grave;  $6.40 \pm 6.17$  vs  $10.21 \pm 4.91$ :  $p = 0.044$ , entre a PA moderadamente grave e grave). Através da análise dos níveis de PLR, representados na tabela 4.8 e na figura 4.12-E, observou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e grave ( $150.1 \pm 82.1$  vs  $240.7 \pm 138.9$ :  $p = 0.007$ ) e uma tendência para o aumento entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $150.1 \pm 82.1$  vs  $180.0 \pm 72.6$ :  $p = 0.525$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $180.0 \pm 72.6$  vs  $240.7 \pm 138.9$ :  $p = 0.201$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Através da análise dos níveis de BUN, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-F, constatou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e a grave ( $14.12 \pm 6.39 \text{mg/dL}$  vs  $43.81 \pm 21.75 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.023$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $18.48 \pm 8.56 \text{mg/dL}$  vs  $43.81 \pm 21.75 \text{mg/dL}$ :  $p < 0.001$ ), não se observando alterações com significado estatístico entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $14.12 \pm 6.39 \text{mg/dL}$  vs  $18.48 \pm 8.56 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.375$ ). Quando analisados os níveis de creatinina, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-G, verificou-se um aumento significativo entre PA ligeira e a grave ( $0.79 \pm 0.27 \text{mg/dL}$  vs  $1.48 \pm 0.79 \text{mg/dL}$ :  $p < 0.001$ ) e entre PA moderadamente grave e a grave ( $0.77 \pm 0.37 \text{mg/dL}$  vs  $1.48 \pm 0.79 \text{mg/dL}$ :  $p < 0.001$ ), não apresentando alterações significativas entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $0.79 \pm 0.27 \text{mg/dL}$  vs  $0.79 \pm 0.37 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.972$ ). Através da análise dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-H, verificou-se uma diminuição significativa entre a PA ligeira e a grave ( $8.82 \pm 0.51 \text{mg/dL}$  vs  $7.94 \pm 1.08 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.043$ ), não se observando alterações com significado estatístico entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $8.82 \pm 0.51 \text{mg/dL}$  vs  $8.53 \pm 0.56 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.196$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $8.53 \pm 0.56 \text{mg/dL}$  vs  $7.94 \pm 1.08 \text{mg/dL}$ :  $p = 0.233$ ). Na avaliação dos níveis de LDH, representados na tabela 4.8 e na figura 4.12-I, observou-se um aumento significativo dos seus níveis entre a PA



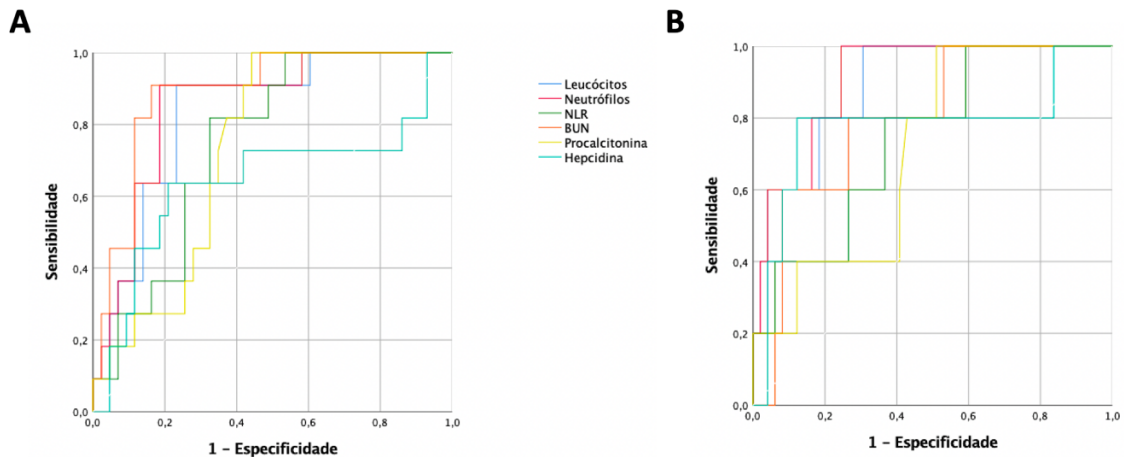
ligeira e a grave ( $465 \pm 128 \text{U/L}$  vs  $1666 \pm 1493 \text{U/L}$ ;  $p=0.033$ ) e uma tendência para o aumento entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $465 \pm 128 \text{U/L}$  vs  $575 \pm 432 \text{U/L}$ ;  $p=0.604$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $575 \pm 432 \text{U/L}$  vs  $1666 \pm 1493 \text{U/L}$ ;  $p=0.058$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Quando foram analisados os níveis de proteínas totais, representados na tabela 4.8 e na figura 4.12-J, observou-se uma diminuição significativa entre a PA ligeira e a grave ( $6.2 \pm 0.5 \text{g/dL}$  vs  $5.1 \pm 0.7 \text{g/dL}$ ;  $p=0.001$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $5.8 \pm 0.5 \text{g/dL}$  vs  $5.1 \pm 0.7 \text{g/dL}$ ;  $p=0.043$ ), verificando uma tendência para a diminuição dos seus níveis entre a PA ligeira e a PA moderadamente grave, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $6.2 \pm 0.5 \text{g/dL}$  vs  $5.8 \pm 0.5 \text{g/dL}$ ;  $p=0.051$ ). Quando se analisaram os níveis de albumina, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-K, verificou-se uma diminuição significativa entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $3.23 \pm 0.43 \text{g/dL}$  vs  $2.93 \pm 0.39 \text{g/dL}$ ;  $p=0.049$ ) e entre a PA ligeira e a grave ( $3.23 \pm 0.43 \text{g/dL}$  vs  $2.55 \pm 0.60 \text{g/dL}$ ;  $p=0.004$ ), tendo-se observado uma tendência para a diminuição entre a PA moderadamente grave e a grave, embora sem significado estatístico ( $2.93 \pm 0.39 \text{g/dL}$  vs  $2.55 \pm 0.60 \text{g/dL}$ ;  $p=0.149$ ). Através da análise dos níveis de PCT, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-L, observou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e a grave ( $1.76 \pm 3.73 \text{ng/mL}$  vs  $7.57 \pm 8.16 \text{ng/mL}$ ;  $p=0.002$ ) e entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $1.76 \pm 3.73 \text{ng/mL}$  vs  $3.76 \pm 6.65 \text{ng/mL}$ ;  $p=0.042$ ) e uma tendência para o aumento dos seus níveis entre a PA moderadamente grave e a grave, embora sem significado estatístico ( $3.76 \pm 6.65 \text{ng/mL}$  vs  $7.57 \pm 8.16 \text{ng/mL}$ ;  $p=0.151$ ). Quando se analisaram os níveis de PCR, representados na tabela 4.8 e na figura 4.12-M, observou-se um aumento significativo todos os níveis de gravidade da PA estudados ( $99.44 \pm 99.37 \text{mg/L}$  vs  $208.49 \pm 111.37 \text{mg/L}$ ;  $p=0.007$ , entre a PA ligeira e moderadamente grave;  $99.44 \pm 99.37 \text{mg/L}$  vs  $325.45 \pm 109.34 \text{mg/L}$ ;  $p < 0.001$ , entre a PA ligeira e a grave;  $208.49 \pm 111.37 \text{mg/L}$  vs  $325.45 \pm 109.34 \text{mg/L}$ ;  $p=0.025$ , entre a PA moderadamente grave e grave). Através da análise dos níveis de hepcidina, expressos na tabela 4.8 e na figura 4.12-N, verificou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e grave ( $46.91 \pm 41.07 \text{ng/mL}$  vs  $275.98 \pm 85.95 \text{ng/mL}$ ;  $p < 0.001$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $74.42 \pm 50.78 \text{ng/mL}$  vs  $275.98 \pm 85.92 \text{ng/mL}$ ;  $p < 0.001$ ), entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $46.91 \pm 41.07 \text{ng/mL}$  vs  $74.42 \pm 50.78 \text{ng/mL}$ ;  $p=0.245$ ) observou-se uma tendência para o aumento dos seus níveis, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas.

Na avaliação da acuidade prognóstica dos marcadores serológicos procedeu-se à análise das AUC (do inglês, *area under the curve*) relativamente à gravidade da PA e à mortalidade. Os resultados encontram-se expressos na tabela 4.10.

**Tabela 4.10** – Tempo de avaliação e AUC dos marcadores serológicos para a gravidade e mortalidade da dos doentes com pancreatite aguda litiásica

AUC (95% IC)	Tempo	PA grave	Mortalidade
<b>Leucócitos</b>	Admissão	0.829 (0.707-0.951)	0.886 (0.767-1)
	48 horas	0.871 (0.774-0.967)	0.915 (0.840-0.990)
<b>Neutrófilos</b>	Admissão	0.852 (0.737-0.967)	0.906 (0.805-1)
	48 horas	0.895 (0.813-0.977)	0.941 (0.880-1)
<b>NLR</b>	Admissão	0.751 (0.615-0.886)	0.743 (0.583-0.948)
	48 horas	0.913 (0.838-0.987)	0.962 (0.912-1)
<b>SIRI</b>	48 horas	0.904 (0.830-0.978)	0.913 (0.834-0.993)
<b>PLR</b>	48 horas	0.674 (0.463-0.885)	0.875 (0.732-1)
<b>BUN</b>	Admissão	0.888 (0.791-0.985)	0.796 (0.619-0.973)
	48 horas	0.842 (0.690-0.993)	0.824 (0.623-1)
<b>Creatinina</b>	48 horas	0.816 (0.670-0.963)	0.850 (0.701-0.999)
<b>LDH</b>	48 horas	0.869 (0.720-1)	0.932 (0.869-0.995)
<b>PCT</b>	Admissão	0.735 (0.601-0.869)	0.708 (0.512-0.904)
	48 horas	0.754 (0.605-0.904)	0.775 (0.572-0.979)
<b>PCR</b>	48 horas	0.892 (0.807-0.976)	0.928 (0.837-1)
<b>Hepcidina</b>	Admissão	0.641 (0.423-0.859)	0.776 (0.499-1)
	48 horas	0.997 (0.987-1)	0.953 (0.899-1)

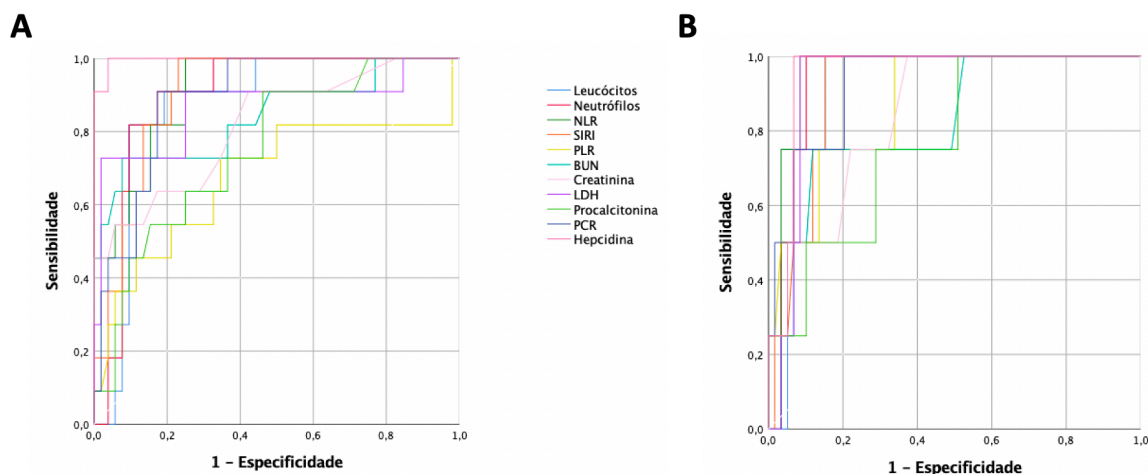
AUC: *area under the curve*; BUN: *blood urea nitrogen*; IC: Intervalo de confiança; LDH: *lactate dehidrogenase*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; PA: pancreatite aguda; PCR: proteína C-reativa; PCT: procalcitonina; PLR: *platelet-lymphocyte ratio*; SIRI: *Systemic Inflammatory Response Index*.



**Figura 4.13** - Comparação das AUC através da curva ROC dos marcadores serológicos, na admissão, na avaliação da gravidade (A) e mortalidade (B) da pancreatite aguda litiásica. AUC: *area under the curve*; BUN: *blood urea nitrogen*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; ROC: *Receiver operating characteristics*.

Os resultados dos valores da AUC avaliados na admissão dos doentes e representados na tabela 4.10 e figura 4.13, revelaram que o BUN (0.888 (95%IC: 0.791-0.985)) apresentou o maior poder preditivo para a gravidade da PA, seguido dos neutrófilos (0.852 (95%IC: 0.737-0.907)) e leucócitos (0.829 (95%IC: 0.707-0.951)). Relativamente à

mortalidade, os neutrófilos apresentaram o maior valor preditivo (0.906 (95%IC: 0.805-1)), seguidos dos leucócitos (0.886 (95%IC: 0.767-1)) e BUN (0.796 (95%IC: 0.619-0.973)).

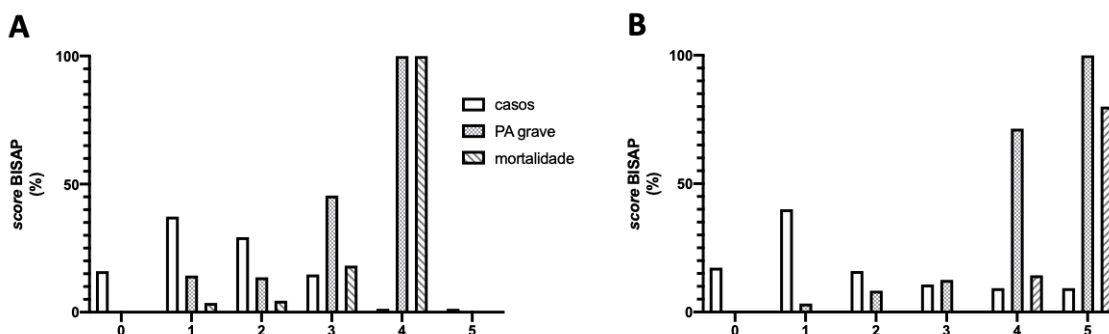


**Figura 4.14** - Comparação das AUC através da curva ROC dos marcadores serológicos, às 48 horas de início dos sintomas, na avaliação da gravidade (**A**) e mortalidade (**B**) da pancreatite aguda litiásica. AUC: *area under the curve*; BUN: *blood urea nitrogen*; LDH: *lactate dehidrogenase*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; PCR: *proteína C-reativa*; PLR: *platelet-lymphocyte ratio*; ROC: *Receiver operating characteristics*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Index*.

Relativamente aos dados obtidos às 48 horas, expressos na tabela 4.10 e na figura 4.14, verificou-se para a gravidade da PA, que o marcador serológico com maior poder preditivo foi a hepcidina (0.997 (95%IC:0.987-1)), seguida da NLR (0.913 (95%IC:0.838-0.987)), SIRS (0.904 (95%IC:0.830-0.978)), neutrófilos (0.895 (95%IC:0.813-0.977)) e PCR (0.892 (95%IC:0.807-0.976)). Quando se analisou o poder preditivo relativo à mortalidade, verificou-se que a NLR (0.962 (95%IC:0.912-1)), apresentou o maior valor, seguido da hepcidina (0.953 (95%IC:0.899-1)), neutrófilos (0.941 (95%IC:0.880-1)), LDH (0.932 (95%IC:0.869-0.995)), PCR (0.928 (95%IC:0.837-1)) e SIRS (0.913 (95%IC:0.834-0.993)).

No sentido de se avaliarem os *scores* de prognóstico de PA, procedeu-se à análise do *score* BISAP, *score* SIRS e MMS na admissão e às 48 horas após o início dos sintomas. Assim, foi efetuada a comparação de cada *score* com a RAC e com a mortalidade, encontrando-se os resultados expressos nas figuras 4.15, 4.16 e 4.17.

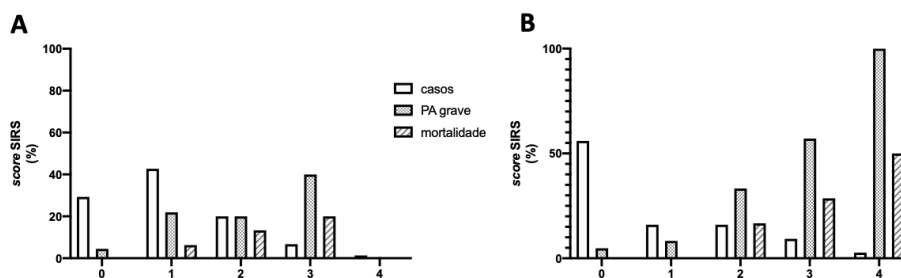
A figura 4.15 representa a distribuição, em percentagem, dos doentes pelos graus do *score* BISAP. As pontuações entre 0 e 2 pontos estão associadas a uma mortalidade menor que 2%, enquanto que as pontuações entre 3 e 5 estão associadas a mais de 15% de risco de mortalidade [137].



**Figura 4.15** - Distribuição da totalidade dos doentes com pancreatite aguda (casos), dos doentes com pancreatite aguda grave (PA grave) e dos casos de mortalidade pelo *score* BISAP (*cutoff*  $\geq 3$ ) avaliados na **A**, admissão e **B**, às 48 horas após o início dos sintomas. Os gráficos estão representados em %. BISAP: *Beside Index for Severity of Acute Pancreatitis*.

A análise dos resultados obtidos na admissão, representados na figura 4.15, revelou que os casos de PA grave estão associados às pontuações mais altas ( $p=0.016$ ). Quando se analisou mais pormenorizadamente o *score* observou-se que 45.5% dos casos de PA grave apresentavam uma pontuação de 3 e que 100% uma pontuação de 4. Na análise da mortalidade verificou-se também, uma associação com as pontuações mais altas ( $p=0.003$ ), observando-se uma mortalidade de 18.2% na pontuação 3 e de 100% na pontuação 4. Às 48 horas, verificou-se que os casos de PA grave estavam também associados às pontuações mais altas ( $p<0.001$ ). Quando se avaliou com mais detalhe o *score*, observou-se que 71.4% dos casos de PA grave apresentavam uma pontuação de 4 e que 100% uma pontuação de 5. Quando se avaliou a mortalidade observou-se uma associação com as pontuações mais altas ( $p<0.001$ ), verificando-se uma mortalidade de 14.3% na pontuação 4 e de 80% na pontuação 5.

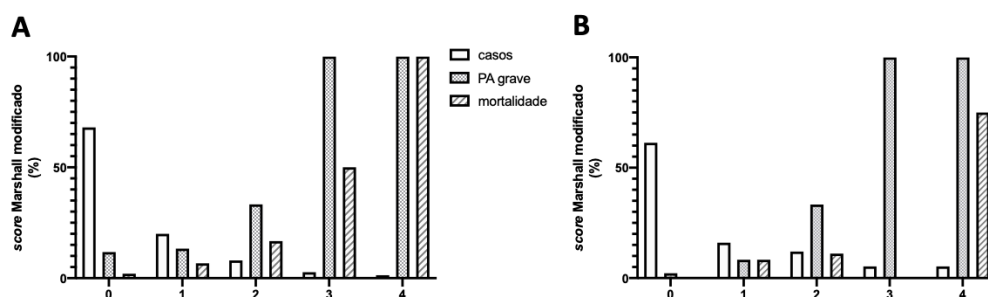
A figura 4.16 representa a distribuição, em percentagem, dos doentes pelos graus do *score* SIRS. As pontuações acima de 2 pontos estão associadas a falência persistente de órgão, necrose pancreática, necessidade de UCI e mortalidade [224].



**Figura 4.16** - Distribuição da totalidade dos doentes com pancreatite aguda (casos), dos doentes com pancreatite aguda grave (PA grave) e dos casos de mortalidade pelo *score* SIRS (*cutoff*  $\geq 2$ ) avaliados na **A**, admissão e **B**, às 48 horas após o início dos sintomas. Os gráficos estão representados em %. SIRS: *Systemic Inflammatory Responde Syndrome*.

Os resultados obtidos, apresentados na figura 4.16, revelaram que, na admissão, os casos de PA grave estão tendencialmente associados às pontuações mais altas, embora sem significado estatístico ( $p=0.282$ ). Quando se analisou mais pormenorizadamente o *score* observou-se que 4.5% dos casos de PA grave encontravam-se na pontuação 0, 21.9% na pontuação de 1, 20% na pontuação 2, 40% na pontuação 3, não se observando doentes na pontuação 4. Quando se analisou a mortalidade constatou-se uma mortalidade nula na pontuação 0, 6.3% na pontuação 1, 13.3% na pontuação 2, 20% na pontuação 3 e sem ocorrência de casos na pontuação 4, sem se verificar significado estatístico ( $p=0.386$ ). Às 48 horas, verificou-se que os casos de PA grave estavam associados às pontuações mais altas ( $p<0.001$ ). Quando se avaliou com mais detalhe o *score*, observou-se que 33.3% dos casos de PA grave apresentavam uma pontuação de 2, 57.1% na pontuação 3 e 100% na pontuação 4. Quando se avaliou a mortalidade observou-se uma associação com as pontuações mais altas ( $p=0.002$ ), verificando-se uma mortalidade de 16.7% na pontuação 2, 28.6% na pontuação 3 e 50% na pontuação 4.

A figura 4.17 representa a distribuição, em percentagem, dos doentes pelos graus do MMS. As pontuações acima de 2 pontos estão associadas a falência persistente de órgão [9].



**Figura 4.17** - Distribuição da totalidade dos doentes com pancreatite aguda (casos), dos doentes com pancreatite aguda grave (PA grave) e dos casos de mortalidade pelo MMS (*cutoff*  $\geq 2$ ) avaliados na **A**, admissão e **B**, às 48 horas após o início dos sintomas. Os gráficos estão representados em %. MMS: *modified Marshall score*.

Os dados obtidos, expressos na figura 4.17, mostraram que na admissão, a PA grave está associada às pontuações mais altas ( $p=0.002$ ). Quando se analisou mais pormenorizadamente o *score* observou-se que 33.3% dos casos de PA grave encontravam-se no score 2, 100% na pontuação de 3 e de 4. Quando se analisou a mortalidade verificou-se, uma associação com as pontuações mais alta ( $p<0.001$ ), observando-se uma mortalidade de 16.7% na pontuação 2, 65% na pontuação 3 e 100% na pontuação 4. Às 48 horas, verificou-se que os casos de PA grave estavam associados às pontuações mais altas ( $p<0.001$ ), observando-se que 33.3% dos casos de PA grave apresentavam uma pontuação de 2, 100% uma pontuação 3 e 100% na pontuação 4. Quando se avaliou a mortalidade

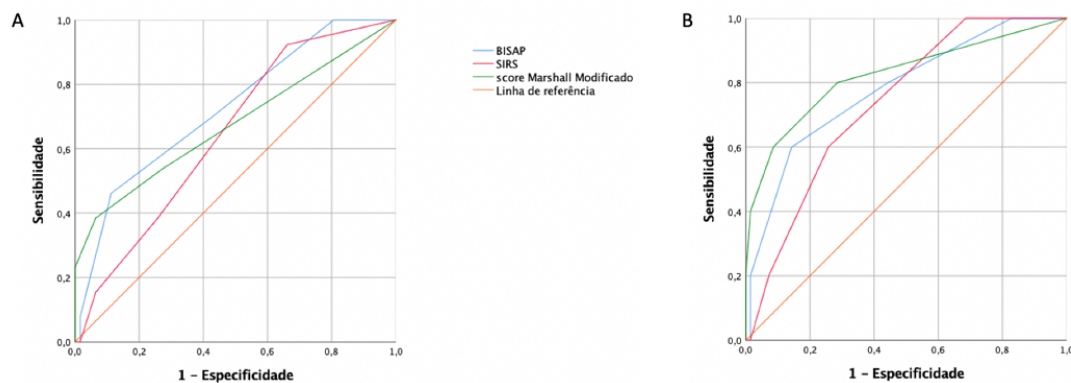
observou-se uma associação com as pontuações mais altas ( $p < 0.001$ ), verificando-se uma mortalidade de 11.1% na pontuação 2, 75% na pontuação 4.

Na avaliação da acuidade prognóstica dos *scores* multifatoriais procedeu-se ao cálculo das AUC para a gravidade da PA e mortalidade. Os resultados encontram-se expressos na tabela 4.11 e nas figuras 4.18 e 4.19.

**Tabela 4.11** - Tempo de avaliação e AUC dos *scores* multifatoriais para a gravidade e mortalidade da pancreatite aguda litiásica.

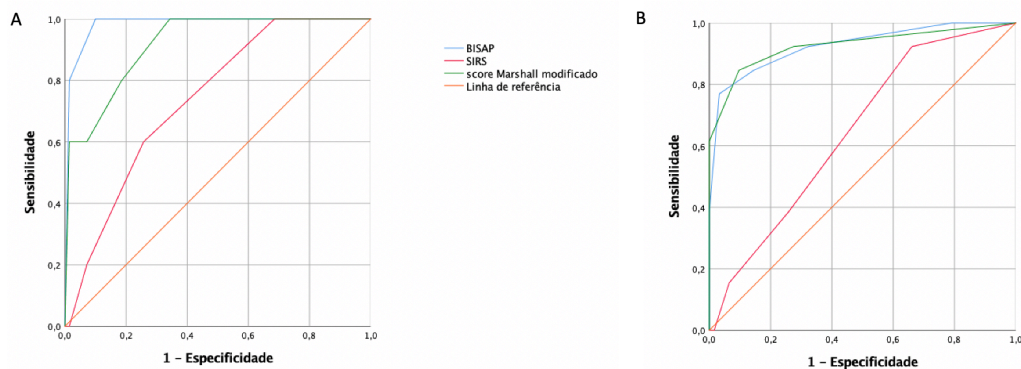
AUC (95% IC)	Tempo	PA grave	Mortalidade
<b>score BISAP</b>	Admissão	0.724 (0.573-0.875)	0.780 (0.564-0.996)
	48 horas	0.926 (0.836-1)	0.983 (0.953-1)
<b>score SIRS</b>	Admissão	0.645 (0.494-0.796)	0.737 (0.551-0.924)
	48 horas	0.833 (0.695-0.972)	0.916 (0.838-0.994)
<b>MMS</b>	Admissão	0.675 (0.490-0.860)	0.823 (0.590-1)
	48 horas	0.926 (0.825-1)	0.917 (0.816-1)

AUC: *area under the curve*; BISAP: *Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis*; IC: Intervalo de Confiança; MMS: *modified Marshall score*; PA: pancreatite aguda; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*.



**Figura 4.18** - Comparação das AUC através da curva ROC dos diferentes *scores* multifatoriais, na admissão, na avaliação da gravidade (A) e mortalidade (B) na pancreatite aguda litiásica. AUC: *area under the curve*. BISAP: *Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*; ROC: *Receiver operating characteristics*.

A análise dos dados da AUC na admissão, expressos na tabela 4.11 e na figura 4.18, demonstrou que o BISAP (0.724 (95%IC:0.573-0.875)) apresentou o maior poder preditivo para a gravidade da PA, seguido do MMS (0.675 (95%IC:0.490-0.860)) e SIRS (0.645 (95%IC:0.494-0.796)). Relativamente à mortalidade o MMS, neste período de tempo estudado, apresentou o maior valor preditivo (0.823 (95%IC:0.590-1)), seguido do BISAP (0.780 (95%IC:0.564-0.996)) e SIRS (0.737 (95%IC:0.551-0.924)).



**Figura 4.19** - Comparação das AUC através da curva ROC dos diferentes scores multifatoriais, às 48 horas após o início dos sintomas, na avaliação da gravidade (A) e mortalidade (B) na pancreatite aguda litíásica. AUC: *area under the curve*. BISAP: *Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*; ROC: *Receiver operating characteristics*.

Os dados obtidos às 48 horas, expressos na tabela 4.11 e na figura 4.19, revelaram, para a gravidade da PA, que o BISAP (0.926 (95%IC:0.836-1)) e o MMS (0.926 (95%IC:0.825-1)) apresentaram o melhor valor preditivo, seguido do SIRS (0.833 (95%IC:0.695-0.972)). Para a mortalidade, os melhores valores preditivos foram o do BISAP (0.983 (95%IC:0.953-1)), seguido do MMS (0.917 (95%IC:0.816-1)) e do SIRS (0.916 (95%IC:0.838-0.994)).

No sentido de se estudar o valor prognóstico da gravidade da PA de cada marcador e score multifatorial, foi efetuada, para o *cutoff* calculado, a análise da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acuidade na admissão e às 48 horas após o início dos sintomas. Os resultados encontram-se representados nas tabelas 4.12 e 4.13.

Na admissão, os resultados expressos na tabela 4.12, mostraram que os leucócitos, para um *cutoff* de  $14.89 \times 10^3 / \mu\text{L}$  apresentaram uma sensibilidade de 0.909 (95%IC:0.844-0.974) e especificidade de 0.767 (95%IC:0.671-0.863); os neutrófilos, para um *cutoff* de  $13.31 \times 10^3 / \mu\text{L}$  mostraram uma sensibilidade de 0.909 (95%IC:0.844-0.974) e especificidade de 0.814 (95%IC:0.726-0.902); o NLR apresentou, para *cutoff* de 14.64 uma sensibilidade de 0.818 (95%IC:0.731-0.905) e especificidade 0.674 (95%IC:0.568-0.780); o BUN, para um *cutoff* de 27.3mg/dL, apresentou uma sensibilidade de 0.818 (95%IC:0.731-0.905) e especificidade de 0.884 (95%IC:0.812-0.956); a PCT, para um *cutoff* de 0.58ng/mL apresentou uma sensibilidade de 0.727 (95%IC:0.626-0.828) e especificidade de 0.651 (95%IC:0.543-0.759); e, a hepcidina, para um *cutoff* de 72.8ng/mL mostrou uma sensibilidade de 0.636 (95%IC:0.528-0.74) e especificidade de 0.791 (95%IC:0.700-0.882). Relativamente aos scores multifatoriais, o score BISAP para um *cutoff*  $\geq 3$  apresentou uma

sensibilidade de 0.462 (95%IC:0.349-0.575) e especificidade de 0.887 (95%IC:0.815-0.959); o *score* SIRS, para um *cutoff*  $\geq 2$  revelou uma sensibilidade de 0.385 (95%IC:0.275-0.495) e especificidade de 0.742 (95%IC:0.643-0.841); e, o MMS, para um *cutoff*  $\geq 2$  mostrou uma sensibilidade de 0.385 (95%IC:0.275-0.495) e especificidade de 0.935 (95%IC:0.879-0.991).

Os dados obtidos relativamente aos valores de sensibilidade e especificidade, para a gravidade da PA às 48 horas após o início dos sintomas, da análise da tabela 4.12, revelaram que os leucócitos, para um *cutoff* de  $12.09 \times 10^3/\mu\text{L}$  apresentaram uma sensibilidade de 0.909 (95%IC:0.844-0.974) e especificidade de 0.808 (95%IC:0.719-0.897); os neutrófilos, para um *cutoff* de  $10.64 \times 10^3/\mu\text{L}$  apresentaram uma sensibilidade de 0.909 (95%IC:0.844-0.974) e especificidade de 0.827 (95%IC:0.671-0.863); o NLR, para um *cutoff* de 10.90 apresentou uma sensibilidade de 0.818 (95%IC:0.731-0.905), especificidade de 0.846 (95%IC:0.764-0.928); o SIRI, para um *cutoff* de 7.14 apresentou uma sensibilidade de 0.818 (95%IC:0.731-0.905) e especificidade de 0.865 (95%IC:0.788-0.942); o PLR, para um *cutoff* de 187.8 apresentou uma sensibilidade de 0.727 (95%IC:0.626-0.828) e especificidade de 0.654 (95%IC:0.546-0.762); o BUN, para um *cutoff* de 26.6mg/dL apresentou uma sensibilidade de 0.727 (95%IC:0.626-0.828) e especificidade de 0.923 (95%IC:0.863-0.983); a creatinina, para um *cutoff* de 0.85mg/dL apresentou uma sensibilidade de 0.727 (95%IC:0.626-0.828) e especificidade de 0.654 (95%IC:0.546-0.762); a LDH, para um *cutoff* de 521U/L apresentou uma sensibilidade de 0.909 (95%IC:0.844-0.974) e especificidade de 0.750 (95%IC:0.652-0.848); a PCR, para um *cutoff* de 150mg/L apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.615 (95%IC:0.505-0.725); e, a hepcidina, para um *cutoff* de 154.7ng/mL apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.962 (95%IC:0.919-1). Relativamente aos *scores* multifatoriais, o *score* BISAP, para um *cutoff*  $\geq 3$  apresentou uma sensibilidade de 0.846 (95%IC:0.764-0.928) e especificidade de 0.855 (95%IC:0.775-0.935); o *score* SIRS, para um *cutoff*  $\geq 2$  apresentou uma sensibilidade de 0.769 (95%IC:0.674-0.864) e especificidade de 0.823 (95%IC:0.737-0.909); e, o MMS, para um *cutoff*  $\geq 2$  apresentou uma sensibilidade de 0.846 (95%IC:0.764-0.928) e especificidade de 0.903 (95%IC:0.836-0.970).



**Tabela 4.12** - Avaliação na sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade (95% IC) dos diferentes marcadores serológicos e scores multifatoriais para a gravidade dos doentes com pancreatite aguda litiásica.

	Tempo	Cutoff	Sen	Esp	VPP	VPN	Acuidade
<b>Leucócitos</b>	Admissão	14.89	0.909 (0.844-0.974)	0.767 (0.671-0.863)	0.440 (0.328-0.552)	0.979 (0.947-1)	0.795 (0.704-0.886)
	48 horas	12.09	0.909 (0.844-0.974)	0.808 (0.719-0.897)	0.435 (0.323-0.547)	0.941 (0.888-0.994)	0.784 (0.691-0.877)
<b>Neutrófilos</b>	Admissão	13.31	0.909 (0.844-0.974)	0.814 (0.726-0.902)	0.478 (0.365-0.591)	0.980 (0.948-1)	0.822 (0.735-0.909)
	48 horas	10.64	0.909 (0.844-0.974)	0.827 (0.671-0.863)	0.476 (0.327-0.552)	0.962 (0.947-1)	0.822 (0.704-0.909)
<b>NLR</b>	Admissão	14.64	0.818 (0.731-0.905)	0.674 (0.568-0.780)	0.357 (0.249-0.465)	0.956 (0.910-1)	0.726 (0.625-0.827)
	48 horas	10.90	0.818 (0.731-0.905)	0.846 (0.764-0.928)	0.450 (0.337-0.563)	0.927 (0.868-1)	0.800 (0.709-0.891)
<b>SIRI</b>	48 horas	7.14	0.818 (0.731-0.905)	0.865 (0.788-0.942)	0.526 (0.413-0.639)	0.963 (0.920-1)	0.850 (0.769-0.931)
<b>PLR</b>	48 horas	187.8	0.727 (0.626-0.828)	0.654 (0.546-0.762)	0.345 (0.237-0.453)	0.933 (0.876-0.990)	0.703 (0.600-0.806)
<b>BUN</b>	Admissão	27.3	0.818 (0.731-0.905)	0.884 (0.812-0.956)	0.500 (0.387-0.613)	0.929 (0.871-0.987)	0.824 (0.738-0.910)
	48 horas	26.6	0.727 (0.626-0.828)	0.923 (0.863-0.983)	0.667 (0.560-0.774)	0.950 (0.901-0.999)	0.893 (0.823-0.963)
<b>Creatinina</b>	48 horas	0.85	0.727 (0.626-0.828)	0.654 (0.546-0.762)	0.300 (0.196-0.404)	0.911 (0.847-0.975)	0.667 (0.560-0.774)
<b>LDH</b>	48 horas	521	0.909 (0.844-0.974)	0.750 (0.652-0.848)	0.407 (0.296-0.518)	0.957 (0.911-1)	0.757 (0.660-0.854)
<b>PCT</b>	Admissão	0.58	0.727 (0.626-0.828)	0.651 (0.543-0.759)	0.286 (0.184-0.388)	0.925 (0.865-0.985)	0.627 (0.518-0.736)
	48 horas	2.83	0.636 (0.527-0.745)	0.750 (0.652-0.848)	0.381 (0.271-0.491)	0.907 (0.841-0.973)	0.760 (0.663-0.857)
<b>PCR</b>	48 horas	150	1 (1-1)	0.615 (0.505-0.725)	0.342 (0.235-0.450)	1 (1-1)	0.667 (0.560-0.774)
<b>Hepcidina</b>	Admissão	72.8	0.636 (0.528-0.744)	0.791 (0.700-0.882)	0.471 (0.359-0.583)	0.900 (0.833-0.967)	0.772 (0.678-0.866)
	48 horas	154.7	1 (1-1)	0.962 (0.919-1)	0.857 (0.778-0.936)	1 (1-1)	0.970 (0.932-1)
<b>BISAP</b>	Admissão	≥ 3	0.462 (0.349-0.575)	0.887 (0.815-0.959)	0.462 (0.349-0.575)	0.887 (0.815-0.959)	0.813 (0.725-0.901)
	48 horas	≥ 3	0.846 (0.764-0.928)	0.855 (0.775-0.935)	0.550 (0.437-0.663)	0.964 (0.922-1)	0.853 (0.773-0.933)
<b>SIRS</b>	Admissão	≥ 2	0.385 (0.275-0.495)	0.742 (0.643-0.841)	0.238 (0.142-0.335)	0.852 (0.772-0.932)	0.680 (0.574-0.786)
	48 horas	≥ 2	0.769 (0.674-0.864)	0.823 (0.737-0.909)	0.476 (0.363-0.589)	0.944 (0.892-0.996)	0.813 (0.725-0.901)
<b>MMS</b>	Admissão	≥ 2	0.385 (0.275-0.495)	0.935 (0.879-0.991)	0.556 (0.444-0.668)	0.879 (0.805-0.953)	0.840 (0.757-0.923)
	48 horas	≥ 2	0.846 (0.764-0.928)	0.903 (0.836-0.970)	0.647 (0.539-0.755)	0.966 (0.925-1)	0.893 (0.823-0.963)

BISAP: *Bedside Index for Severity of Acute Pancreatitis*; BUN: *blood urea nitrogen*; Esp: especificidade; IC: intervalo de confiança; LDH: desidrogenase láctica; MMS: *modified Marshall score*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; PCR: proteína C-reativa; PCT: *procalcitonina*; PLR: *platelet-lymphocyte ratio*; Sen: sensibilidade; SIRI: *Systemic Inflammatory Response Index*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Pancreatite Aguda: Novas Fronteiras no Prognóstico

**Tabela 4.13** – Avaliação na sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade (95% IC) dos diferentes marcadores serológicos e scores multifatoriais para a mortalidade dos doentes com pancreatite aguda litiásica.

	<b>Tempo</b>	<b>Cutoff</b>	<b>Sen</b>	<b>Esp</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>Acuidade</b>
<b>Leucócitos</b>	Admissão	17.53	0.800 (0.709-0.891)	0.816 (0.728-0.904)	0.250 (0.152-0.348)	0.982 (0.952-1)	0.822 (0.354-0.909)
	48 horas	14.14	1 (1-1)	0.847 (0.766-0.928)	0.250 (0.152-0.348)	0.983 (0.954-1)	0.824 (0.738-0.910)
<b>Neutrófilos</b>	Admissão	15.77	0.800 (0.709-0.891)	0.837 (0.753-0.921)	0.267 (0.167-0.367)	0.983 (0.954-1)	0.836 (0.752-0.920)
	48 horas	13.13	1 (0.709-0.891)	0.898 (0.728-0.904)	0.333 (0.152-0.348)	0.984 (0.952-1)	0.890 (0.735-0.961)
<b>NLR</b>	Admissão	15.30	0.800 (0.709-0.891)	0.633 (0.524-0.742)	0.154 (0.072-0.236)	0.979 (0.947-1)	0.685 (0.580-0.790)
	48 horas	14.34	1 (1-1)	0.915 (0.852-0.978)	0.364 (0.255-0.473)	0.984 (0.956-1)	0.893 (0.823-0.963)
<b>SIRI</b>	48 horas	7.89	1 (1-1)	0.847 (0.766-0.928)	0.267 (0.167-0.367)	1 (1-1)	0.849 (0.768-0.930)
<b>PLR</b>	48 horas	241.1	0.750 (0.652-0.848)	0.864 (0.786-0.942)	0.308 (0.204-0.412)	0.984 (0.956-1)	0.865 (0.788-0.942)
<b>BUN</b>	Admissão	26.2	0.800 (0.709-0.891)	0.735 (0.635-0.835)	0.174 (0.088-0.260)	0.980 (0.948-1)	0.730 (0.630-0.830)
	48 horas	28.7	0.750 (0.652-0.848)	0.881 (0.808-0.954)	0.333 (0.226-0.440)	0.984 (0.956-1)	0.880 (0.806-0.954)
<b>Creatinina</b>	48 horas	1.05	0.750 (0.652-0.848)	0.780 (0.686-0.874)	0.176 (0.090-0.262)	0.966 (0.925-1)	0.787 (0.694-0.880)
<b>LDH</b>	48 horas	734	1 (1-1)	0.915 (0.852-0.978)	0.190 (0.101-0.279)	1 (1-1)	0.905 (0.837-0.971)
<b>PCT</b>	Admissão	0.58	0.600 (0.489-0.711)	0.592 (0.481-0.703)	0.086 (0.025-0.149)	0.950 (0.901-0.999)	0.547 (0.434-0.660)
	48 horas	2.83	0.750 (0.652-0.848)	0.712 (0.610-0.814)	0.190 (0.101-0.279)	0.981 (0.950-1)	0.760 (0.663-0.857)
<b>PCR</b>	48 horas	150	1 (1-1)	0.559 (0.447-0.671)	0.132 (0.055-0.210)	1 (1-1)	0.560 (0.448-0.672)
<b>Hepcidina</b>	Admissão	131.2	0.800 (0.710-0.890)	0.878 (0.804-0.952)	0.364 (0.256-0.472)	0.978 (0.945-1)	0.860 (0.782-0.938)
	48 horas	221.6	1 (1-1)	0.932 (0.875-0.989)	0.500 (0.388-0.612)	0.983 (0.954-1)	0.924 (0.864-0.984)
<b>BISAP</b>	Admissão	≥ 3	0.600 (0.489-0.711)	0.857 (0.778-0.936)	0.231 (0.136-0.326)	0.968 (0.928-1)	0.840 (0.757-0.923)
	48 horas	≥ 3	1 (1-1)	0.786 (0.693-0.879)	0.250 (0.152-0.348)	1 (1-1)	0.800 (0.709-0.891)
<b>SIRS</b>	Admissão	≥ 2	0.600 (0.489-0.711)	0.743 (0.644-0.842)	0.143 (0.064-0.222)	0.936 (0.923-1)	0.733 (0.633-0.833)
	48 horas	≥ 2	1 (1-1)	0.771 (0.676-0.866)	0.238 (0.142-0.334)	1 (1-1)	0.787 (0.694-0.880)
<b>MMS</b>	Admissão	≥ 2	0.600 (0.489-0.711)	0.914 (0.851-0.977)	0.333 (0.226-0.440)	0.970 (0.931-1)	0.893 (0.823-0.963)
	48 horas	≥ 2	0.800 (0.709-0.891)	0.814 (0.726-0.902)	0.235 (0.139-0.331)	0.983 (0.954-1)	0.813 (0.725-0.901)

BISAP: *Bedside Index for Severity of Acute Pancreatitis*; BUN: *blood urea nitrogen*; Esp: especificidade; IC: intervalo de confiança; LDH: desidrogenase láctica; MMS: *modified Marshall score*; NLR: *neutrophil-lymphocyte ratio*; PCR: proteína C-reativa; PCT: procalcitonina; PLR: *platelet-lymphocyte ratio*; Sen: sensibilidade; SIRI: *Systemic Inflammatory Response Index*; SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Os resultados expressos na tabela 4.13 revelaram que, na admissão, relativamente à mortalidade da PA, os leucócitos, para um *cutoff* de  $17.53 \times 10^3/\mu\text{L}$  apresentaram uma sensibilidade de 0.800 (95%IC:0.709-0.891) e especificidade de 0.816 (95%IC:0.728-0.904); os neutrófilos, para um *cutoff* de  $15.77 \times 10^3/\mu\text{L}$  mostraram uma sensibilidade de 0.800 (95%IC:0.709-0.891) e especificidade de 0.837 (95%IC:0.753-0.921); o NLR, para um *cutoff* de 15.30 mostrou uma sensibilidade de 0.800 (95%IC:0.709-0.891) e especificidade de 0.633 (95%IC:0.524-0.742); o BUN, para um *cutoff* de 26.2mg/dL apresentou uma sensibilidade de 0.800 (95%IC:0.709-0.891) e especificidade de 0.735 (95%IC:0.635-0.835); a PCT, para um *cutoff* de 0.58ng/mL apresentou uma sensibilidade de 0.600 (95%IC:0.481-0.703) e especificidade de 0.592 (95%IC:0.481-0.703); e, a hepcidina, para um *cutoff* de 131.2ng/mL revelou uma sensibilidade de 0.800 (95%IC:0.710-0.890) e especificidade de 0.878 (95%IC:0.804-0.952). Relativamente aos *scores* multifatoriais, o *score* BISAP para um *cutoff*  $\geq 3$  apresentou uma sensibilidade de 0.600 (95%IC:0.489-0.711) e especificidade de 0.857 (95%IC:0.778-0.936); o *score* SIRS, para um *cutoff*  $\geq 2$  mostrou uma sensibilidade de 0.600 (95%IC:0.489-0.711) e especificidade de 0.743 (95%IC:0.644-0.842); o MMS, para um *cutoff*  $\geq 2$  revelou uma sensibilidade de 0.600 (95%IC:0.489-0.711) e especificidade de 0.914 (95%IC:0.851-0.977).

Às 48 horas após o início dos sintomas, de acordo com a tabela 4.13, para a mortalidade, os leucócitos, para um *cutoff* de  $14.14 \times 10^3/\mu\text{L}$  apresentaram uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.847 (95%IC:0.766-0.928); os neutrófilos, para um *cutoff* de  $13.13 \times 10^3/\mu\text{L}$  mostraram uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.898 (95%IC:0.728-0.904); o NLR, para um *cutoff* de 14.34 apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.915 (95%IC:0.852-0.978); o SIRI, para um *cutoff* de 7.89 apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.847 (95%IC:0.766-0.928); o PLR, para um *cutoff* de 241.1 apresentou uma sensibilidade de 0.750 (95%IC:0.652-0.848) e especificidade de 0.864 (95%IC:0.786-0.942); o BUN, para um *cutoff* de 28.7mg/dL apresentou uma sensibilidade de 0.750 (95%IC:0.652-0.848) e especificidade de 0.881 (95%IC:0.808-0.954); a creatinina, para um *cutoff* de 1.05mg/dL mostrou uma sensibilidade de 0.750 (95%IC:0.652-0.848) e especificidade de 0.780 (95%IC:0.686-0.874); a LDH, para um *cutoff* de 734U/L revelou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.915 (95%IC:0.852-0.978); a PCT, para um *cutoff* de 2.83ng/mL apresentou uma sensibilidade de 0.750 (95%IC:0.652-0.848) e especificidade de 0.712 (95%IC:0.610-0.814); a PCR, para um *cutoff* de 150mg/L apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.559 (95%IC:0.447-0.671); e a hepcidina, para um *cutoff* de 221.6ng/mL apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.932 (95%IC:0.875-0.989). Relativamente aos *scores* multifatoriais, o

score BISAP, para um *cutoff*  $\geq 3$  apresentou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.786 (95%IC:0.693-0.879); o score SIRS, para um *cutoff*  $\geq 2$  mostrou uma sensibilidade de 1 (95%IC:1-1) e especificidade de 0.771 (95%IC:0.676-0.866) e o MMS para um *cutoff*  $\geq 2$  revelou uma sensibilidade de 0.800 (95%IC:0.709-0.891) e especificidade de 0.814 (95%IC:0.726-0.902)

#### 4.2.3. Avaliação da lesão oxidativa e do potencial de membrana mitocondrial na gravidade da PA

Na tabela 4.14 estão descritas as diferenças relativamente a algumas variáveis sociodemográficas entre o grupo controlo (indivíduos saudáveis) e os doentes com PA litiásica em estudo.

**Tabela 4.14** - Dados sociodemográficos dos doentes com pancreatite aguda litiásica internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULSCB. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, n (%) e mediana (percentil25-percentil75) (<sup>†</sup> teste t de Student e <sup>\*</sup> teste de Mann-Whitney).

	Controlo (n=15)	PA (n=43)	PA ligeira (n=15)	PA moderadamente grave (n=15)	PA grave (n=13)	<i>p</i>
Idade	69 $\pm$ 12.9	69 $\pm$ 17.4	60 $\pm$ 18.0	73 $\pm$ 14.1	74 $\pm$ 17.1	NS <sup>*</sup>
Sexo feminino	66.7%	65.1%	11 (73.3%)	10 (66.7%)	7 (53.8%)	NS <sup>†</sup>
IMC $\geq 30$	26.7%	18.6%	3 (20%)	3 (20%)	2 (15.4%)	NS <sup>†</sup>
Charlson Índice	3 (1-4)	3 (1-4)	1 (1-3)	3 (3-4)	3 (2-4)	NS <sup>*</sup>

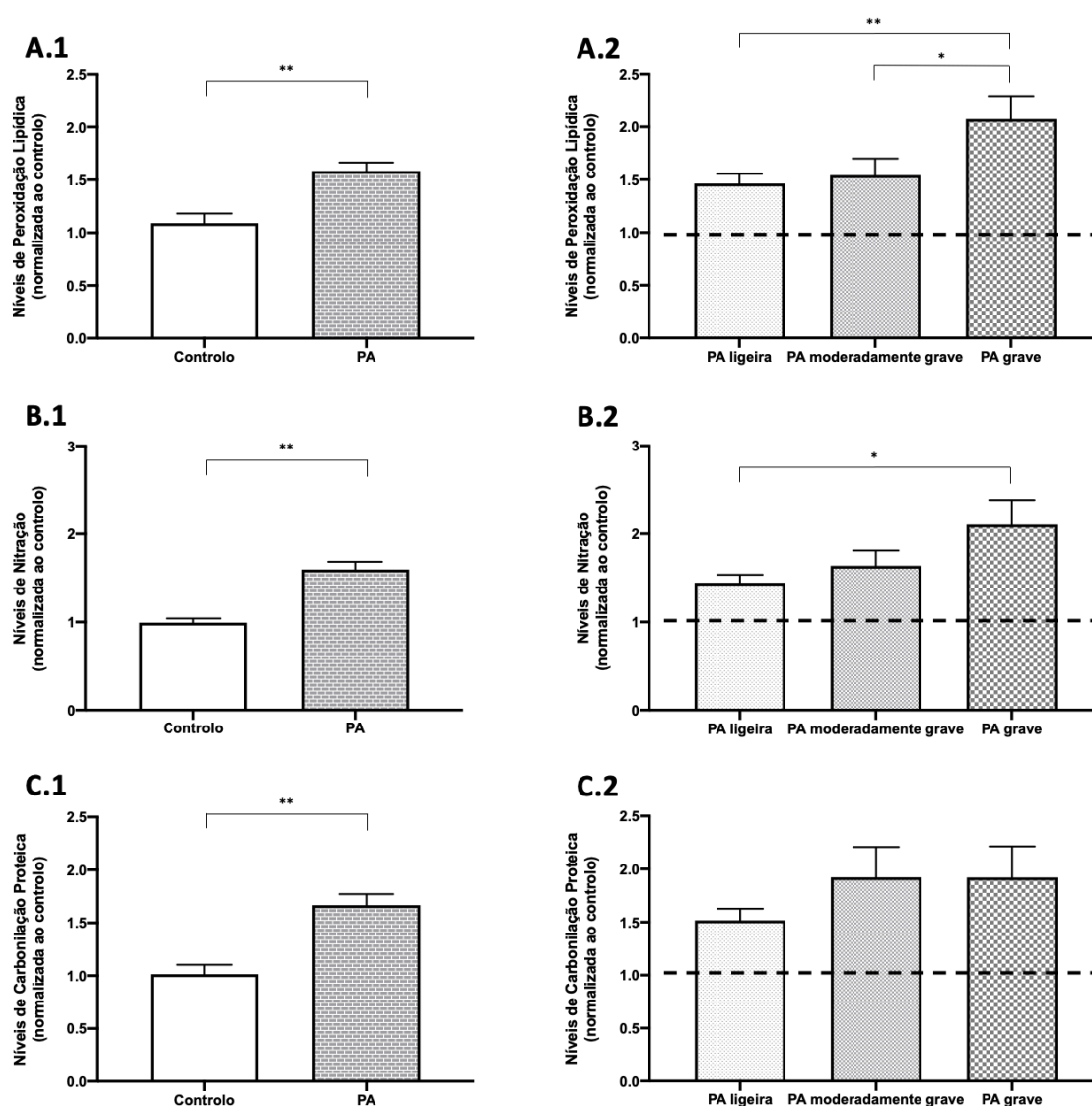
IMC: Índice de massa corporal; NS: *not significant*; PA: pancreatite aguda

Os resultados expressos na tabela 4.14, revelaram que foram incluídos para a avaliação do SO 15 indivíduos saudáveis, para o grupo controlo e 43 doentes com PA litiásica. Segundo a RAC, 15 doentes tiveram PA ligeira, 15 moderadamente grave e 13 PA grave. A idade média dos doentes com PA litiásica foi de 69 anos e com uma razão de sexo feminino:masculino de 1.87:1 (28/15). As comorbilidades dos doentes com PA incluíram doença cardiovascular, insuficiência renal crónica e diabetes *mellitus*. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os controlos e a amostra de doentes com PA para a idade ( $p=0.944$ ), sexo ( $p=0.515$ ), IMC ( $p=0.915$ ) e índice de Charlson ( $p=0.834$ ).

##### 4.2.3.1. Peroxidação lipídica, nitração das proteínas e carbonilação proteica

Na avaliação da produção de ROS durante o processo inflamatório pancreático, recorreu-se à análise da atividade da HNE para o estudo da peroxidação lipídica, da 3-NO para a nitração das proteínas e os níveis de carbonilação proteica. A figura 4.20 representa

os resultados obtidos relativamente aos níveis das diferentes ROS entre o grupo controlo e os doentes com PA litiásica.



**Figura 4.20** - Avaliação dos níveis das espécies reativas de oxigénio no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litiásica. **A.1** e **A.2**, Níveis de peroxidação lipídica pela atividade da HNE, **B.1** e **B.2**, Níveis da nitração pela atividade da 3-NO, **C.1** e **C.2**, Níveis da carbonilação proteica. HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; 3-NO: 3-nitro-tirosina; RAC: *revised Atlanta classification*. Os resultados estão normalizados em relação ao controlo (indivíduos saudáveis), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pelo método *slot blot*. As diferenças estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  e \*\* representa  $p < 0.01$  (nos gráficos A.1, B.1 e C.1 os resultados foram obtidos através do teste de Mann-Whitney; nos gráficos A.2, B.2 e C.2 os resultados foram obtidos através da ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher).

A análise dos resultados expressos na figura 4.20-A.1, revelou um aumento significativo nos níveis da HNE entre o grupo controlo e os doentes com PA ( $1.59 \pm 0.69$  normalizado ao controlo:  $p = 0.001$ ). Quando se compararam os níveis da 3-NO, representados na figura 4.20-B.1, verificou-se também, um aumento significativo entre o

grupo controle e os doentes com PA ( $1.60 \pm 0.74$  normalizada ao controle:  $p=0.001$ ). De igual forma, quando se analisaram os níveis da carbonilação das proteínas, expressos na figura 4.20-C.1, verificou-se um aumento significativo entre o grupo controle e os doentes com PA ( $1.67 \pm 0.90$  normalizada ao controle:  $p=0.001$ ). Quando se analisaram os níveis da HNE entre os três graus de gravidade definidos pela RAC, expressos na figura 4.20-A.2, observou-se um aumento significativo entre a PA ligeira e a grave ( $1.46 \pm 0.63$  vs  $1.54 \pm 0.62$  normalizada ao controle:  $p=0.001$ ), entre a PA moderadamente grave e a grave ( $1.54 \pm 0.62$  vs  $2.07 \pm 0.79$  normalizada ao controle:  $p=0.028$ ) e uma tendência para a elevação dos seus níveis entre a PA ligeira e a moderadamente grave, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $1.46 \pm 0.63$  vs  $1.54 \pm 0.62$  normalizada ao controle:  $p=0.225$ ). Através da análise da figura 4.20-B.2, verificou-se um aumento significativo dos níveis de 3-NO entre a PA ligeira e a grave ( $1.45 \pm 0.63$  vs  $2.10 \pm 1.01$  normalizada ao controle:  $p=0.017$ ) e uma tendência para o aumento entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $1.45 \pm 0.63$  vs  $1.63 \pm 0.67$  normalizada ao controle:  $p=0.439$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $1.63 \pm 0.67$  vs  $2.10 \pm 1.01$  normalizada ao controle:  $p=0.092$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Por sua vez, quando se avaliou os níveis de carbonilação proteica, expressos na figura 4.20-C.2, observou-se uma tendência para o aumento entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $1.51 \pm 0.75$  vs  $1.92 \pm 1.10$  normalizada ao controle:  $p=0.308$ ) e entre a PA ligeira e a grave, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $1.51 \pm 0.75$  vs  $1.92 \pm 1.06$  normalizada ao controle:  $p=0.328$ ), não se observando diferença entre a PA moderadamente grave e a grave ( $1.92 \pm 1.10$  vs  $1.92 \pm 1.06$  normalizada ao controle:  $p=0.995$ ).

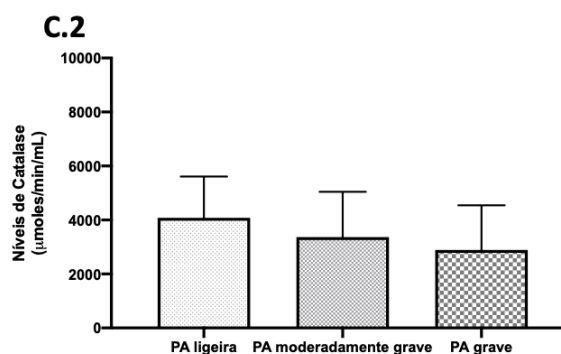
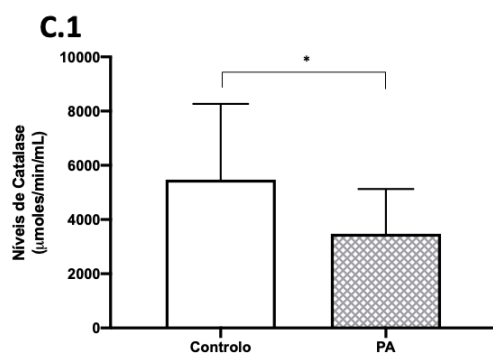
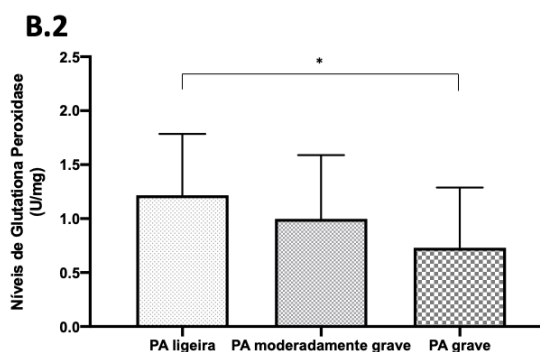
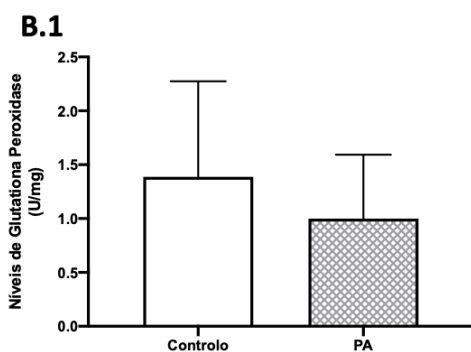
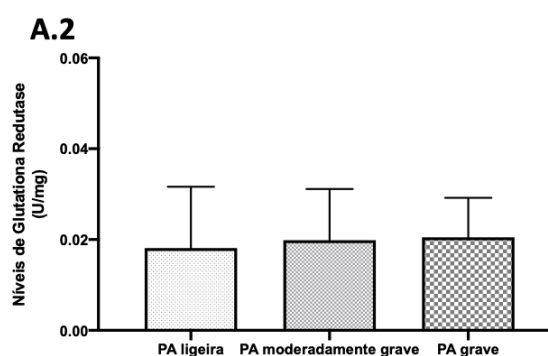
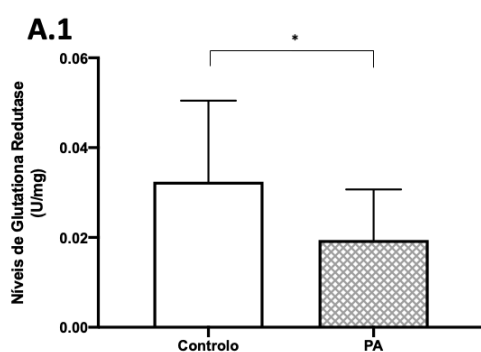
#### **4.2.3.2. Defesas antioxidantes**

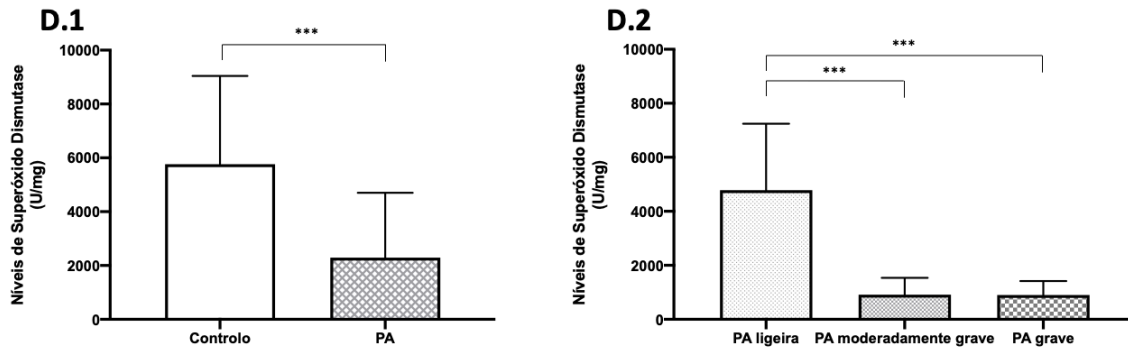
Na determinação do papel das defesas antioxidantes na PA, recorreu-se ao estudo dos níveis da GR, GPx, CAT e SOD. A tabela 4.15 e a figura 4.21 representam os resultados obtidos na comparação entre o grupo controle e os doentes com PA e entre os diferentes graus de gravidade da PA.

**Tabela 4.15** - Distribuição dos níveis séricos das defesas antioxidantes no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litiásica. Foram analisados os níveis da glutatona redutase (U/mg), glutatona peroxidase (U/mg), catalase ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ ), superóxido dismutase (U/mg). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão.

ROS	Controlo	PA	PA ligeira	PA moderadamente grave	PA grave
GR	0.031 $\pm$ 0.018	0.020 $\pm$ 0.011	0.018 $\pm$ 0.014	0.021 $\pm$ 0.010	0.021 $\pm$ 0.009
GPx	1.446 $\pm$ 0.889	1.015 $\pm$ 0.595	1.258 $\pm$ 0.566	1.016 $\pm$ 0.582	0.730 $\pm$ 0.558
CAT	4866 $\pm$ 1593	3404 $\pm$ 1682	4000 $\pm$ 1553	3264 $\pm$ 1699	2861 $\pm$ 1724
SOD	5763 $\pm$ 3278	2391 $\pm$ 2470	4987 $\pm$ 2420	1028 $\pm$ 692	840 $\pm$ 486

CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; RAC: *revised Atlanta score*; SOD: superóxido dismutase.





**Figura 4.21** – Avaliação dos níveis das defesas antioxidantes no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litíásica. **A.1 e A.2**, Níveis de glutatona redutase, **B.1 e B.2**, Níveis de glutatona peroxidase, **C.1 e C.2**, Níveis de catalase, **D.1 e D.2**, Níveis de superóxido dismutase. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (nos gráficos A.1, B.1, C.1 e D.1 os resultados foram obtidos através do teste de Mann-Whitney; nos gráficos A.2, B.2, C.2 e D.1 os resultados foram obtidos através da ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher).

Da análise dos resultados expressos na tabela 4.15 e na figura 4.21-A.1, verificou-se uma diminuição significativa nos níveis da GR entre o grupo controlo e os doentes com PA ( $0.031 \pm 0.018 \text{ U/mg}$  vs  $0.02 \pm 0.011 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.019$ ). Quando se compararam os níveis da GPx, representados na tabela 4.15 e na figura 4.21-B.1, verificou-se uma tendência para a diminuição entre o grupo controlo e os doentes com PA, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas ( $1.446 \pm 0.889 \text{ U/mg}$  vs  $1.015 \pm 0.595 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.254$ ). Quando se analisaram os níveis de CAT, expressos na tabela 4.15 e na figura 4.21-C.1, verificou-se uma diminuição significativa entre o grupo controlo e os doentes com PA ( $4866 \pm 1593 \mu\text{moles/min/mL}$  vs  $3404 \pm 1682 \mu\text{moles/min/mL}$ ;  $p = 0.010$ ). Igualmente, através da análise da tabela 4.15 e da figura 4.21-D.1, verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de SOD entre o grupo controlo e os doentes com PA ( $5763 \pm 3278 \text{ U/mg}$  vs  $2391 \pm 2470 \text{ U/mg}$ ;  $p < 0.001$ ). Quando se analisaram os níveis de GR entre os três graus de gravidade definidos pela RAC, expressos na tabela 4.15 e na figura 4.21-A.2, observou-se uma ligeira tendência para um aumento entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $0.018 \pm 0.014 \text{ U/mg}$  vs  $0.021 \pm 0.01 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.689$ ) e entre a PA ligeira e a grave  $0.018 \pm 0.014 \text{ U/mg}$  vs  $0.021 \pm 0.009 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.598$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas e não se observando alterações entre a PA moderadamente grave e a grave ( $0.021 \pm 0.01 \text{ U/mg}$  vs  $0.021 \pm 0.009 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.888$ ). Através da análise da tabela 4.15 e da figura 4.21-B.2, verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de GPx entre a PA ligeira e a grave ( $1.258 \pm 0.566 \text{ U/mg}$  vs  $0.730 \pm 0.558 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.035$ ) e uma tendência para a diminuição entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $1.258 \pm 0.566 \text{ U/mg}$  vs  $1.016 \pm 0.582 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.304$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $1.016 \pm 0.582 \text{ U/mg}$  vs  $0.730 \pm 0.558 \text{ U/mg}$ ;  $p = 0.235$ ),



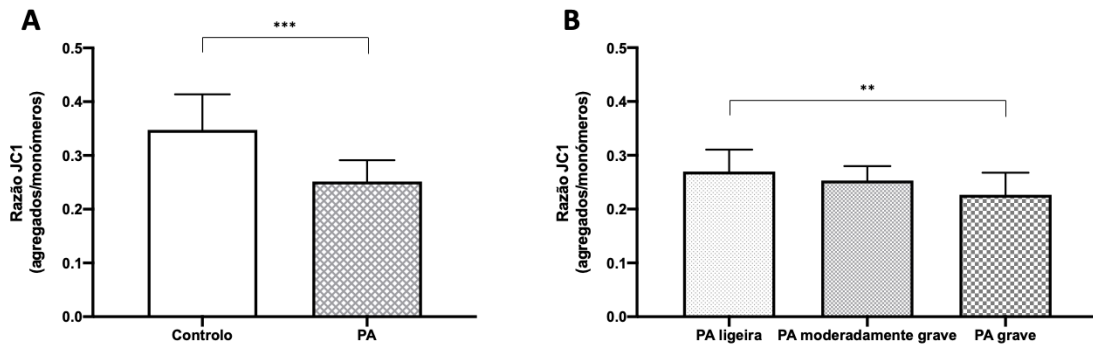
embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Quando se avaliou os níveis de CAT, expressos na tabela 4.15 e na figura 4.21-C.2, observou-se uma tendência para a diminuição entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $4000 \pm 1553 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$  vs  $3264 \pm 1699 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ :  $p=0.242$ ), entre a PA ligeira e a grave ( $4000 \pm 1553 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$  vs  $2861 \pm 1724 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ :  $p=0.059$ ) e entre a PA moderadamente grave e a grave ( $3264 \pm 1699 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$  vs  $2861 \pm 1724 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ :  $p=0.447$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. Quando se analisaram os níveis de SOD entre os três graus de gravidade definidos pela RAC, expressos na tabela 4.15 e na figura 4.21-D.2, observou-se uma diminuição significativa entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $4987 \pm 2420 \text{U}/\text{mg}$  vs  $1028 \pm 692 \text{U}/\text{mg}$ :  $p < 0.001$ ) e entre a PA ligeira e a grave ( $4987 \pm 2420 \text{U}/\text{mg}$  vs  $840 \pm 486 \text{U}/\text{mg}$ :  $p < 0.001$ ) e não se observaram alterações entre a PA moderadamente grave e a grave ( $1028 \pm 692 \text{U}/\text{mg}$  vs  $840 \pm 486 \text{U}/\text{mg}$ :  $p=0.889$ ).

#### 4.2.3.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria tem um papel fundamental na manutenção da homeostasia celular produzindo aproximadamente 95% do ATP necessário. A integridade da mitocôndria pode ser avaliada através da sonda fluorescente JC1, que permite o estudo do PMM. A razão JC1 agregados/monómeros reflete a integridade mitocondrial e pode ser assumida como uma medida funcional mitocondrial.

**Tabela 4.16** - Distribuição do potencial de membrana mitocondrial no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litiásica. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pela sonda fluorescente JC1.

PMM	Controlo	PA	PA ligeira	PA moderadamente grave	PA grave
<b>Razão JC1</b>	$0.348 \pm 0.066$	$0.251 \pm 0.040$	$0.270 \pm 0.041$	$0.253 \pm 0.027$	$0.227 \pm 0.041$



**Figura 4.22** – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial no grupo controlo e nos doentes com pancreatite aguda litíásica. **A**, Comparação entre o grupo controlo e os doentes com pancreatite aguda litíásica; **B**, comparação entre os três graus de gravidade da pancreatite aguda definidos por Banks et al. [9]. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. Medição realizada pela sonda fluorescente JC1 pela razão JC1 agregados (mitocôndrias funcionais)/monómeros (mitocôndrias disfuncionais). As diferenças estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (Figura A: teste de Mann-Whitney; Figura B: ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher)

Os dados obtidos, representada na tabela 4.16 e na figura 4.22-A, mostraram uma diminuição significativa na razão agregados e monómeros, indicando uma disfunção mitocondrial entre o grupo controlo e doentes com PA ( $0.348 \pm 0.066$  vs  $0.251 \pm 0.04$ :  $p < 0.001$ ). Quando se compararam os três graus de gravidade da PA, expressos da tabela 4.15 e na figura 4.22-B, verificou-se uma diminuição significativa entre a PA ligeira e a grave ( $0.270 \pm 0.041$  vs  $0.227 \pm 0.041$ :  $p = 0.004$ ) e uma tendência para a diminuição entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $0.270 \pm 0.041$  vs  $0.253 \pm 0.027$ :  $p = 0.221$ ) e a PA moderadamente grave e a grave ( $0.253 \pm 0.02$  vs  $0.227 \pm 0.041$ :  $p = 0.066$ ), embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas.

#### 4.2.4. Avaliação do perfil metabólico em doentes com PA

Na tabela 4.17 estão descritas as diferenças relativamente às variáveis demográficas entre o grupo controlo (indivíduos saudáveis) e os doentes com PA litíásica em estudo.

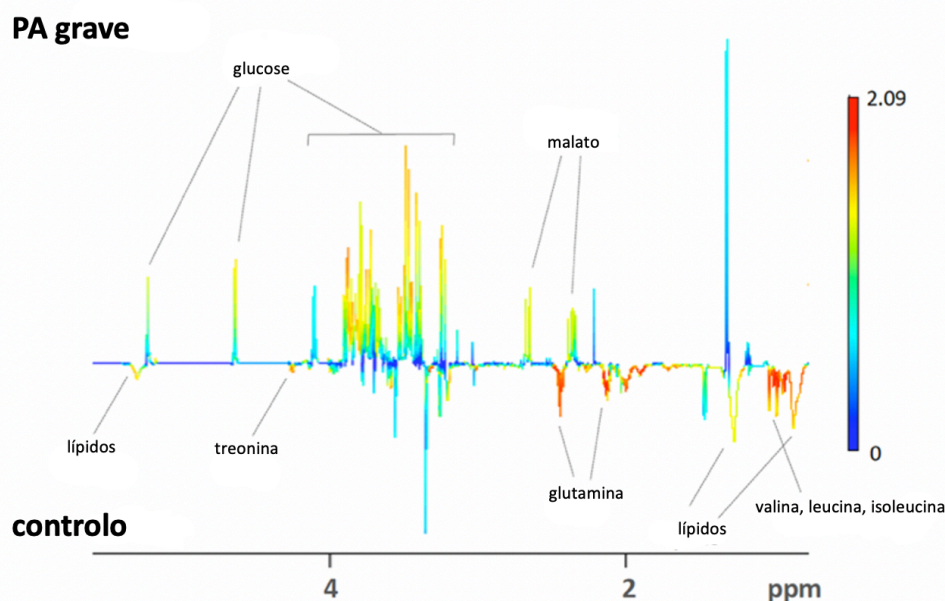
**Tabela 4.17** - Dados sociodemográficos e clínicos do grupo controlo e dos doentes com pancreatite aguda litíásica internados no Serviço de Cirurgia Geral do HAL-ULECB. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, n (%) e mediana (percentil25-percentil75) (\*teste t de student e \*teste de Mann-Whitney).

	Controlo (n=11)	Amostra (n=29)	PA ligeira (n=10)	PA moderadamente grave (n=9)	PA grave (n=10)	<i>p</i>
<b>Idade</b>	69 $\pm$ 14.6	65 $\pm$ 18.9	54 $\pm$ 16.8	69 $\pm$ 17.2	73 $\pm$ 18.7	NS <sup>‡</sup>
<b>Sexo feminino</b>	54.5%	69.0%	8 (80%)	6 (66.7%)	6 (60%)	NS <sup>†</sup>
<b>IMC <math>\geq</math> 30</b>	18.2%	20.7%	2 (22.2%)	2 (22.2%)	2 (20%)	NS <sup>†</sup>
<b>Charlson Índice</b>	3 (1-4)	3 (1-4)	1 (0-2)	3 (1-4)	3 (1-4)	NS <sup>‡</sup>

IMC: Índice de massa corporal; PA: pancreatite aguda.

No estudo do perfil metabolômico foram incluídos 11 indivíduos saudáveis (grupo controlo) e 29 doentes com PA litiásica. Segundo a RAC, 10 doentes tiveram PA ligeira, 9 moderadamente grave e 10 PA grave. De acordo com os dados expressos na tabela 4.17, a idade média dos doentes com PA litiásica foi de 65 anos, com uma frequência para o sexo feminino de 69%. As comorbilidades dos doentes com PA incluíram doença cardiovascular, insuficiência renal crónica e diabetes *mellitus*. Não se verificaram significado estatístico entre os controlos e a amostra de doentes com PA para a idade ( $p=0.562$ ), sexo ( $p=0.406$ ), IMC ( $p=0.864$ ) e índice de Charlson ( $p=0.523$ ).

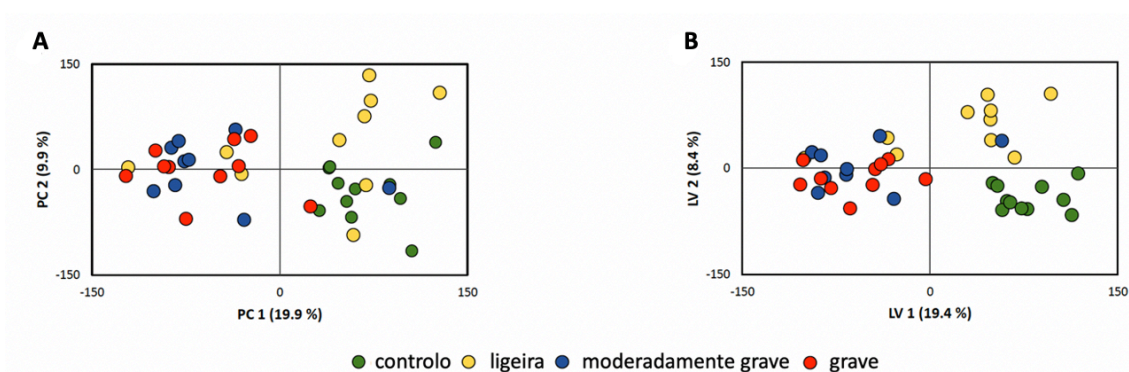
Na determinação dos efeitos moleculares do processo inflamatório pancreático, nas amostras de plasma de doentes com PA litiásica, recorreu-se à abordagem metabolômica baseada em espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. A análise visual dos espectros médios de plasma do grupo controlo e doentes com PA divididos pelos três graus de gravidade (ligeira, moderadamente grave e grave), expressa na figura 4.23, forneceu informações sobre as características gerais dos perfis metabólicos.



**Figura 4.23** - Exemplo de um espectro obtido com a sequência típica de ressonância magnética nuclear de próton cpmg para o plasma do grupo controlo e dos doentes com pancreatite aguda grave na admissão. Os picos observados são coloridos para variáveis de acordo com a importância variável para a projeção (VIP, do inglês *Variable Importance to the Projection*) com a indicação de algumas atribuições. São indicados sinais de alguns metabolitos identificados.

No sentido de uma melhor avaliação das alterações no metaboloma plasmático relacionadas com a PA, foi aplicada a análise multivariada não direcionada. A análise de PCA representada na figura 4.24-A foi aplicada para testar a estrutura interna de dados e para procurar tendências de *cluster*, possíveis separações e discrepâncias dos grupos em

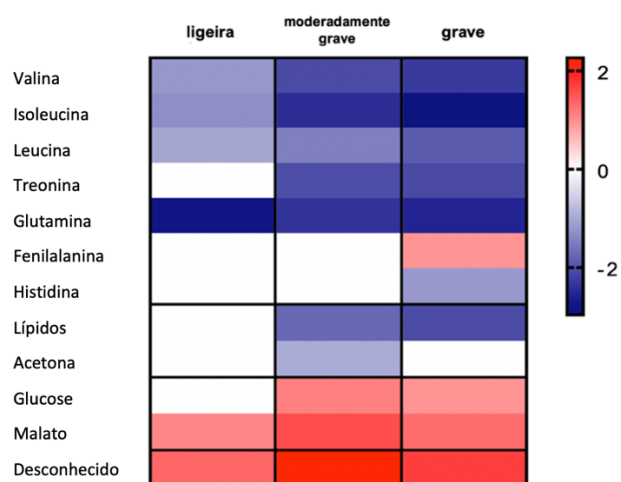
estudo. Adicionalmente, os dados foram submetidos a análise de PLS-DA, análise utilizada para maximizar a diferença entre os grupos, representada na figura 4.24-B.



**Figura 4.24** – Gráficos de pontuação obtidos por modelos **A.** PCA e **B.** PLS-DA após a análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de próton obtidos com a sequência cpmg de plasma do grupo controlo e doentes com os três graus de gravidade da pancreatite aguda. PCA: análise de componentes principais; PLS-DA: análise de discriminantes – mínimos quadrados parciais.

Como pode ser observado na figura 4.24, os dados mostraram *clustering* de acordo com os grupos estudados. Verificou-se, de uma forma geral, sobreposição entre o grupo controlo e os doentes com PA ligeira e entre os doentes com PA moderadamente grave e grave, indicando semelhanças de metaboloma.

Estes resultados podem também ser apresentados sob a forma de *heatmap* dos efeitos biológicos relevantes ( $ES > 0.7$ ) representativos do grupo de doentes com PA grave, e ilustrados na figura 4.25.



**Figura 4.25** - *Heatmap* representando as principais alterações do metaboloma plasmático associadas à gravidade da pancreatite aguda litiásica quando comparadas com o grupo controlo.

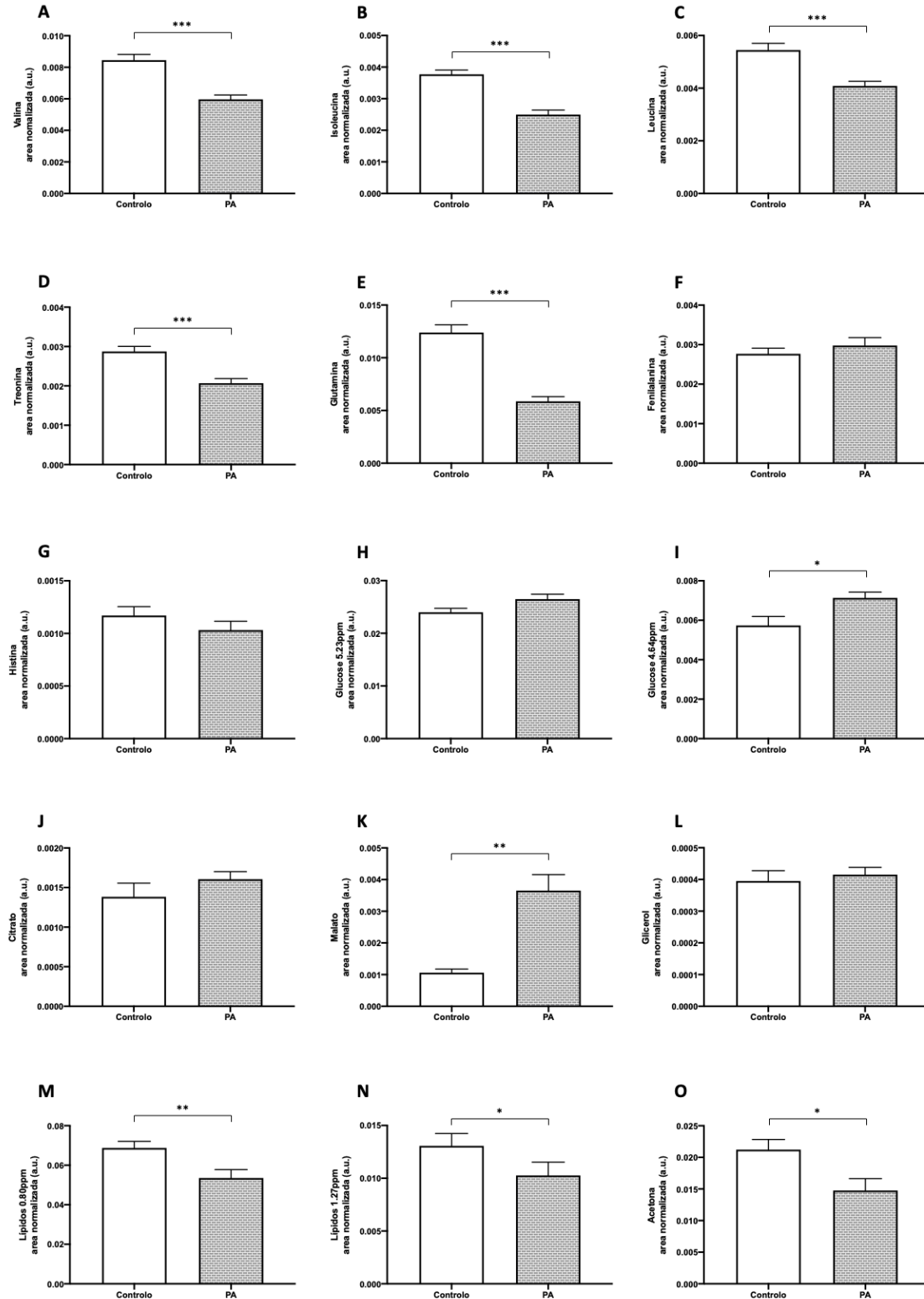
A avaliação dos metabolitos efetuada entre o grupo controlo e os doentes com PA litiásica encontra-se representada na tabela 4.18 e na figura 4.26.

**Tabela 4.18** - Distribuição dos níveis plasmáticos dos diversos metabolitos identificados entre o grupo controlo e os doentes com pancreatite aguda litiásica. Os resultados estão normalizados em relação ao grupo controlo. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão.

<b>Metabolito</b>	<b>Controlo</b>	<b>PA</b>
<b>Valina</b>	0.0085 $\pm$ 0.0012	0.006 $\pm$ 0.0015
<b>Isoleucina</b>	0.0039 $\pm$ 0.0006	0.0025 $\pm$ 0.0008
<b>Leucina</b>	0.0054 $\pm$ 0.0009	0.0041 $\pm$ 0.0009
<b>Treonina</b>	0.0029 $\pm$ 0.0004	0.0021 $\pm$ 0.0006
<b>Glutamina</b>	0.0124 $\pm$ 0.0024	0.0059 $\pm$ 0.0029
<b>Fenilalanina</b>	0.0028 $\pm$ 0.0005	0.0029 $\pm$ 0.0011
<b>Histidina</b>	0.0012 $\pm$ 0.0003	0.0010 $\pm$ 0.0005
<b>Glucose_5.23ppm</b>	0.024 $\pm$ 0.0025	0.027 $\pm$ 0.005
<b>Glucose_4.64ppm</b>	0.0057 $\pm$ 0.0015	0.0071 $\pm$ 0.0016
<b>Citrato</b>	0.0014 $\pm$ 0.0006	0.0016 $\pm$ 0.0005
<b>Malato</b>	0.0011 $\pm$ 0.0004	0.0037 $\pm$ 0.0027
<b>Glicerol</b>	0.0004 $\pm$ 0.0001	0.0004 $\pm$ 0.0001
<b>Lipidos_0.8ppm</b>	0.0690 $\pm$ 0.011	0.0535 $\pm$ 0.023
<b>Lipidos_1.27ppm</b>	0.0131 $\pm$ 0.0039	0.0103 $\pm$ 0.007
<b>Acetona</b>	0.0212 $\pm$ 0.0054	0.0148 $\pm$ 0.0101

PA: pancreatite aguda.

## Pancreatite Aguda: Novas Fronteiras no Prognóstico



**Figura 4.26** – Avaliação dos níveis de metabolitos no plasma entre o grupo controlo e os doentes com pancreatite aguda litiásica. **A**, valina; **B**, isoleucina; **C**, leucina; **D**, treonina; **E**, glutamina; **F**, fenilalanina; **G**, histidina; **H**, glucose 5.23ppm; **I**, glucose 4.64ppm; **J**, citrato; **K**, malato; **L**, glicerol; **M**, lípidos 0.80ppm; **N**, lípidos 1.27ppm; **O**, acetona. Os resultados estão normalizados em relação ao grupo controlo. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$ , \*\* representa  $p < 0.01$  e \*\*\* representa  $p < 0.001$  (A, B, C, D, F, G, H, I, J, M e O: teste *t* de *student*; E, K, L e N: teste de Mann-Whitney)

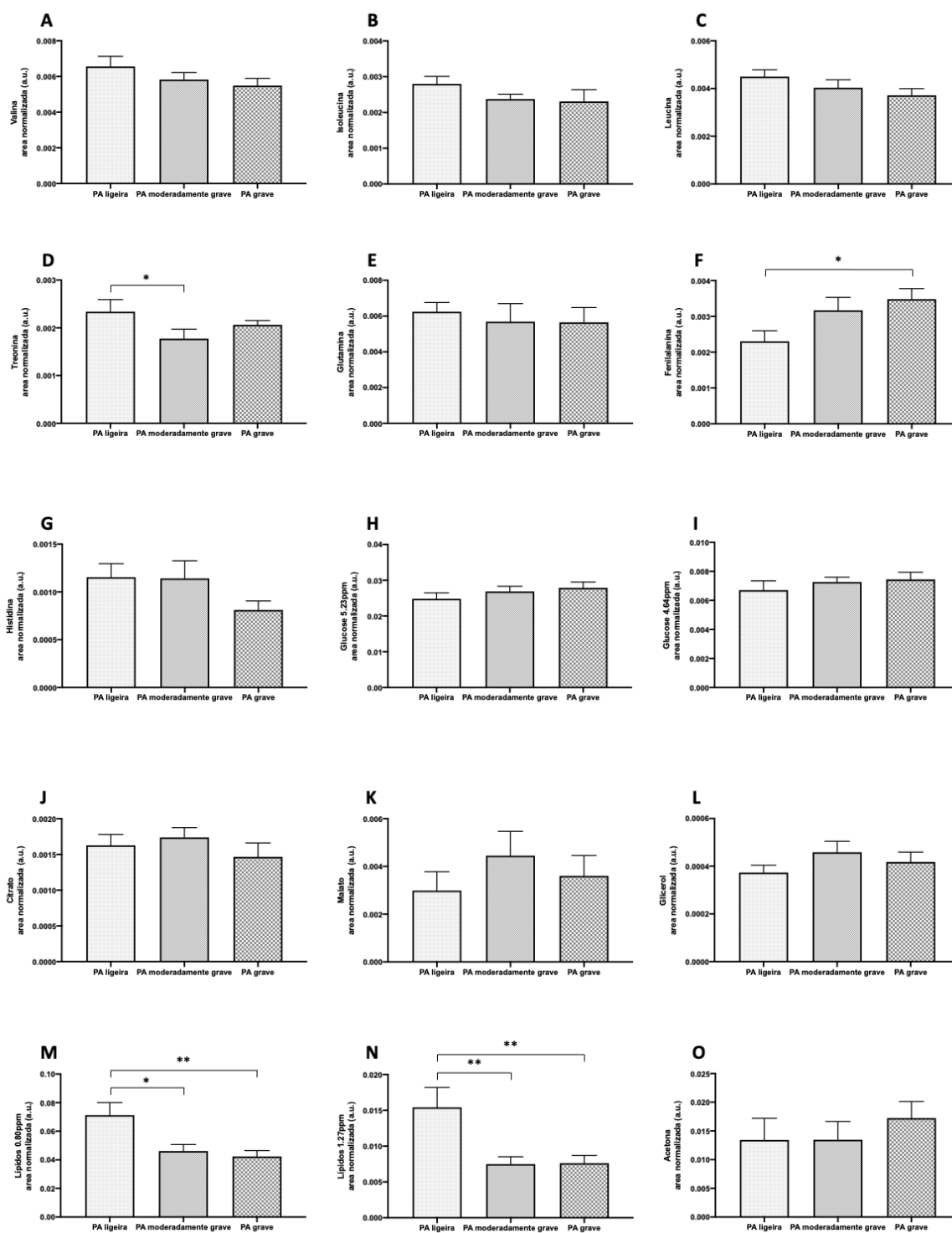
Os resultados obtidos, expressos na figura 4.26, mostraram que o metaboloma plasmático foi altamente sensível para nos doentes com PA litiásica. Observaram-se alterações estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os doentes com PA para os seguintes metabolitos: valina ( $0.0085 \pm 0.0012$  vs  $0.006 \pm 0.0015$ ;  $p < 0.001$ ), isoleucina ( $0.0039 \pm 0.0006$  vs  $0.0025 \pm 0.0008$ ;  $p < 0.001$ ), leucina ( $0.0054 \pm 0.0009$  vs  $0.0041 \pm 0.0009$ ;  $p < 0.001$ ), treonina ( $0.0029 \pm 0.0004$  vs  $0.0021 \pm 0.0006$ ;  $p < 0.001$ ), glutamina ( $0.0124 \pm 0.0024$  vs  $0.0059 \pm 0.0029$ ;  $p < 0.001$ ), glucose 4.64ppm ( $0.0057 \pm 0.0015$  vs  $0.0071 \pm 0.0016$ ;  $p = 0.010$ ), malato ( $0.0011 \pm 0.0004$  vs  $0.0037 \pm 0.0027$ ;  $p = 0.002$ ), lípidos 0.80ppm ( $0.069 \pm 0.011$  vs  $0.0535 \pm 0.023$ ;  $p = 0.008$ ), lípidos 1.27ppm ( $0.0131 \pm 0.0039$  vs  $0.0103 \pm 0.0007$ ;  $p = 0.017$ ). Não se verificando alterações com significado estatístico na fenilalanina ( $p = 0.591$ ), histidina ( $p = 0.175$ ), glucose 5.23ppm ( $p = 0.139$ ), citrato ( $p = 0.294$ ), glicerol ( $p = 0.654$ ) e acetato (0.840).

A análise dos níveis de metabolitos identificados entre os diferentes graus de gravidade da PA encontra-se expressa na tabela 4.19 e na figura 4.27.

**Tabela 4.19** - Distribuição dos níveis plasmáticos dos diversos metabolitos identificados nos doentes com pancreatite aguda litiásica. Os resultados estão normalizados em relação ao grupo controlo. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão.

	PA ligeira	PA moderadamente grave	PA grave
<b>Valina</b>	0.0066 $\pm$ 0.0018	0.0058 $\pm$ 0.0012	0.055 $\pm$ 0.0013
<b>Isoleucina</b>	0.0028 $\pm$ 0.0007	0.0024 $\pm$ 0.0004	0.0023 $\pm$ 0.0010
<b>Leucina</b>	0.0045 $\pm$ 0.0009	0.004 $\pm$ 0.0009	0.0037 $\pm$ 0.0009
<b>Treonina</b>	0.0023 $\pm$ 0.0008	0.0018 $\pm$ 0.0006	0.0021 $\pm$ 0.0003
<b>Glutamina</b>	0.0062 $\pm$ 0.0016	0.0057 $\pm$ 0.0003	0.0056 $\pm$ 0.0003
<b>Fenilalanina</b>	0.0023 $\pm$ 0.0009	0.0032 $\pm$ 0.0011	0.0035 $\pm$ 0.0009
<b>Histidina</b>	0.0012 $\pm$ 0.0003	0.0011 $\pm$ 0.0005	0.0008 $\pm$ 0.0003
<b>Glucose_5.23ppm</b>	0.025 $\pm$ 0.0053	0.027 $\pm$ 0.0043	0.028 $\pm$ 0.0057
<b>Glucose_4.64ppm</b>	0.0067 $\pm$ 0.0002	0.0073 $\pm$ 0.0009	0.00744 $\pm$ 0.0015
<b>Citrato</b>	0.0016 $\pm$ 0.0005	0.0017 $\pm$ 0.0004	0.0015 $\pm$ 0.0006
<b>Malato</b>	0.0029 $\pm$ 0.0025	0.0044 $\pm$ 0.0031	0.0036 $\pm$ 0.0027
<b>Glicerol</b>	0.0004 $\pm$ 0.0001	0.005 $\pm$ 0.0001	0.0004 $\pm$ 0.0001
<b>Lípidos_0.8ppm</b>	0.0713 $\pm$ 0.0277	0.0461 $\pm$ 0.014	0.0535 $\pm$ 0.023
<b>Lípidos_1.27ppm</b>	0.0154 $\pm$ 0.0088	0.0075 $\pm$ 0.0031	0.0103 $\pm$ 0.007
<b>Acetona</b>	0.0134 $\pm$ 0.012	0.0134 $\pm$ 0.0172	0.0148 $\pm$ 0.0101

PA: pancreatite aguda.



**Figura 4.27** – Avaliação dos níveis de metabólitos no plasma de doentes com pancreatite aguda litiásica. **A**, valina; **B**, isoleucina; **C**, leucina; **D**, treonina; **E**, glutamina; **F**, fenilalanina; **G**, histidina; **H**, glucose 5.23ppm; **I**, glucose 4.64ppm; **J**, citrato; **K**, malato; **L**, glicerol; **M**, lípidos 0.80ppm; **N**, lípidos 1.27ppm; **O**, acetona. Os resultados estão normalizados em relação ao grupo controlo. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0.05$ , \*\* representa  $p < 0.01$  (A, B, C, D, F, G, H, I, J, M e O: ANOVA com teste *post-hoc* Tukey; E, K, L e N: ANOVA com teste *post-hoc* LSD de Fisher)



Os dados obtidos, representados na figura 4.27, relevaram que o metaboloma plasmático foi sensível para as formas graves da PA litiásica. Observaram-se alterações estatisticamente significativas no metabolito treonina, expressas na figura 4.26-D, entre a PA ligeira grave e a moderadamente grave ( $0.0023 \pm 0.0008$  vs  $0.0018 \pm 0.0006$ :  $p=0.049$ ), na fenilalanina, expressas na figura 4.26-F, entre a PA ligeira e a grave ( $0.0023 \pm 0.0009$  vs  $0.0035 \pm 0.0009$ :  $p=0.033$ ), nos lípidos 0.80ppm, expressas na figura 4.26-M, entre a PA ligeira e moderadamente grave ( $0.0713 \pm 0.0277$  vs  $0.0461 \pm 0.0134$ :  $p=0.025$ ) e entre a PA ligeira e a grave ( $0.0713 \pm 0.0277$  vs  $0.0420 \pm 0.0130$ :  $p=0.007$ ) e nos lípidos 1.27ppm, expressas na figura 4.26-N, entre a PA ligeira e a moderadamente grave ( $0.0154 \pm 0.0088$  vs  $0.0075 \pm 0.0031$ :  $p=0.006$ ) e entre a PA ligeira e a grave ( $0.0154 \pm 0.0088$  vs  $0.0103 \pm 0.007$ :  $p=0.006$ ).



## 5. Discussão

Neste trabalho de investigação foi desenvolvido um estudo pré-clínico, como componente experimental, com o recurso a ratos Wistar onde se pretendeu a otimização de alguns modelos de PA, entre os quais dois modelos que mimetizam a etiologia litiásica e a compreensão da fisiopatologia deste processo inflamatório com o estudo do SO. Posteriormente, foi realizado um estudo clínico, com uma amostra exclusivamente constituída por doentes com PA litiásica, com o objetivo de estudar e identificar biomarcadores de prognóstico de gravidade da PA, com recurso às proteínas de fase aguda, aos produtos do SO e aos metabolitos plasmáticos.

### 5.1. Estudo Pré-Clínico

Os modelos animais têm sido uma ferramenta fundamental para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na PA, e assim responder a questões de índole clínica. O modelo murino que consiste na laqueação distal do ducto biliopancreático comum próximo à sua inserção no duodeno, ao mimetizar a obstrução da ampola de Vater por um cálculo, com o conseqüente refluxo biliar para o ducto pancreático, tem por base a hipertensão ductal com o extravasamento das enzimas pancreáticas e conseqüente autodigestão e lesão celular [29,225-227]. O modelo que consiste na laqueação duodenal proximal e distal, à junção entre o ducto biliopancreático comum e o duodeno, baseia-se no aumento da pressão do lúmen duodenal e no conseqüente refluxo do conteúdo intestinal para o ducto biliopancreático comum, sendo um modelo ideal para o estudo da necrose pancreática [29,228]. O modelo de indução de PA, baseado em altas doses de um secretagogo, a ceruleína, um análogo da CCK [228], apesar de induzir apenas PA edematosa e ligeira, permitiu o estudo das alterações que ocorrem na fase precoce da PA em humanos [229].

No presente estudo, observou-se, nos modelos murinos de indução de PA, um aumento significativo dos níveis de amilase ( $p < 0.001$ ) e da lipase ( $p < 0.001$ ) quando comparados com o grupo controlo, confirmando a indução do processo inflamatório pancreático. Na avaliação do processo inflamatório e da sua gravidade, verificaram-se elevações significativas dos níveis de PCT ( $p < 0.001$ ) entre o grupo controlo e os modelos murinos de PA. A PCT é um marcador inflamatório que se encontra bem documentado na relação quer com o processo inflamatório em geral, quer na avaliação da gravidade da PA, tanto em modelos animais como em ambiente clínico [170,186,230,231].

Nos modelos animais a caracterização da gravidade do processo inflamatório pancreático é complexa, sendo, maioritariamente, baseada nas alterações histológicas [29]. Os parâmetros histológicos descritos na literatura associados à PA são o edema, a necrose, a necrose gorda, as alterações nas células acinares, a inflamação, a hemorragia, a vacuolização e a lipomatose [232]. O recurso à avaliação histológica do tecido pancreático é aplicado em múltiplos estudos com base num único modelo murino e num aspeto específico da PA, quer na fisiopatologia, quer na avaliação de eventuais terapias. Os parâmetros histológicos, dependendo dos autores, foram agrupados de diferentes formas e com atribuição de diferentes pontuações [232].

No presente estudo foram avaliados o edema, a necrose, o infiltrado inflamatório, a hemorragia e a vacuolização. Na PA, as alterações verificadas a nível do interstício são consideradas secundárias à lesão microvascular, levando ao edema e à adesão leucocitária ao endotélio, com a consequente progressão do processo inflamatório e da lesão vascular, resultando em hemorragia [233]. O desenvolvimento do edema pode ser mediado pelas espécies reativas de oxigénio (ROS), nomeadamente, os produtos da peroxidação lipídica e da nitração das proteínas [234-236]. No entanto, o processo mais comum na formação do edema é o aumento da permeabilização capilar, nas alterações na microcirculação e no extravasamento de proteínas plasmáticas [233]. O edema pode facilitar a progressão da lesão acinar para a necrose celular, devido a conter ácidos gordos livres, libertados no tecido adiposo pela lipase pancreática, em quantidades tóxicas para as células acinares e ductais [237]. A necrose é caracterizada pela perda da integridade e viabilidade celular em resposta a graves lesões das células, entre as quais a inflamação [233]. Nos modelos que mimetizam a PA litiásica, os ácidos biliares provocam um distúrbio na homeostasia do  $Ca^{2+}$  intracelular, levando a uma disfunção mitocondrial com aumento da produção de ROS, edema pancreático, processo inflamatório e necrose acinar [238]. A necrose no processo inflamatório pancreático desencadeia a SIRS que recruta PMN, causando libertação de ROS e por fim MODS [91]. A infiltração de células inflamatórias no pâncreas é um importante processo na PA [233]. O infiltrado inflamatório é normalmente iniciado pela produção local de mediadores pró-inflamatórios dos neutrófilos, macrófagos, linfócitos, endotélio e mastócitos [239,240]. O mecanismo proposto inclui a libertação de mediadores inflamatórios, a ativação do tripsinogénio em tripsina e a geração de ROS [241]. A lesão vascular dos vasos sanguíneos pancreáticos e consequente hemorragia, é normalmente secundária às alterações da célula acinar na PA. Esta lesão é caracterizada por distúrbios da circulação capilar manifestados por vasodilatação, inflamação, necrose e hemorragia. Estas alterações vão ser, também, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e consequente infiltrado inflamatório [233]. A vacuolização das células acinares, por sua vez, resulta de um processo degenerativo que leva à acumulação intercelular de diferentes tipos

de substâncias, incluindo fluido, lípidos, fosfolípidos e glicoproteínas [242]. A vacuolização é um dos primeiros sinais de lesão celular na PA, apesar deste processo ainda não ser totalmente compreendido. No entanto, os vacúolos citoplasmáticos estão ligados à alteração dos grânulos de zimogénio e à formação de autofagossomas no processo inflamatório pancreático nos humanos [243], outros estudos relacionam a vacuolização com a autofagia [244].

Quando se analisou cada modelo individualmente, verificou-se no modelo A, modelo da laqueação do ducto biliopancreático comum próximo à sua inserção no duodeno, a presença de edema, necrose, infiltrado inflamatório e hemorragia, não se observando vacuolização. Por sua vez, no modelo B, modelo da laqueação duodenal em ansa fechada, observou-se, com maior gravidade, os mesmos parâmetros observados no modelo A e a presença, embora rara, de vacuolização. No modelo C, o modelo de hiperestimulação com análogo da CCK, apenas o edema e a vacuolização foram verificados com graus de moderado e grave. Estas observações são concordantes com as descritas na literatura. Oshshio *et al.* [245], descreveram a presença de edema, necrose e hemorragia no modelo A, Dickson *et al.* [246], relativamente ao modelo B, observaram edema intralobular e necrose hemorrágica e Lampel *et al.* [228] e Jaworek *et al.* [247], caracterizaram o modelo C por edema acompanhado de infiltração perivascular de leucócitos e vacuolização das células acinares.

No entanto, na avaliação dos modelos A e B, constatou-se uma grande variabilidade no grau de gravidade de cada um dos parâmetros histológicos avaliados. No sentido de uma maior uniformização da gravidade da PA dos modelos murinos, os parâmetros histológicos foram pontuados de 0 a 3, exceto a necrose, que, quando severa, isto é, presente em mais de 30% da glândula pancreática, assumiu uma pontuação de 12 pontos. Com a aplicação deste *score*, constatou-se que, da totalidade dos animais submetidos a indução de PA, 50% foram classificados com PA ligeira, 33.3% moderada e 16.7% grave.

A avaliação da PCT permitiu confirmar a aplicabilidade do *score* proposto, tendo-se verificado aumentos significativos entre os níveis de PCT e os diferentes graus de gravidade da PA: entre ligeira e moderada ( $p < 0.05$ ), entre moderada e grave ( $p < 0.001$ ) e ligeira e grave ( $p < 0.001$ ). Foi também demonstrado que o *score* histológico de gravidade da PA se correlacionou com os níveis de PCT ( $r = 0.917$ ).

A utilização deste *score* poderá ser benéfica sob o ponto fisiopatológico, uma vez que permitirá uma melhor compreensão do processo inflamatório nos diferentes graus de gravidade da PA verificados nos doentes humanos, dando um maior poder aos estudos translacionais.

Um dos mecanismos associados à fisiopatologia da PA é o SO, que tem sido reconhecido como um importante mediador, não só nos eventos iniciais do processo inflamatório pancreático, como na progressão para SIRS [248-250]. Em 1984, o SO foi associado à patogênese da PA, tendo-lhe sido atribuído o papel de mediador nas alterações da permeabilidade capilar [251]. No processo inflamatório pancreático, o equilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes é afetado, originando a lesão tecidual [89,252].

A grande maioria dos trabalhos que envolvem o SO na PA são efetuados em modelos murinos, baseados em altas doses de ceruleína, um análogo da CCK. No presente estudo, foram utilizados dois modelos murinos cirúrgicos, que mimetizam a PA litiásica, a causa mais frequente de PA [253]. A obstrução do ducto biliopancreático por cálculos biliares está associada a um aumento na pressão intraductal, e na exposição das células acinares e ductais aos ácidos biliares. Este processo pode bloquear a exocitose acinar, originar a colocalização dos grânulos de zimogénio com as hidrolases lisossômicas e a ativação precoce das enzimas pancreáticas, induzindo disfunção mitocondrial, depleção de ATP, alterações da homeostasia intracelular do  $Ca^{2+}$  e elevação da produção de ROS [238,254,255]. As ROS causam dano oxidativo nos lípidos, proteínas e DNA, modulando os fatores de transcrição e transdução [256]. À medida que o nível do SO aumenta, ocorre a morte da célula acinar. Existem dois mecanismos pelo qual este processo pode ocorrer: necrose e apoptose. A necrose está associada a uma intensa resposta inflamatória, o que não se verifica na apoptose. Estudos clínicos tem sugerido que a PA ligeira tende a desenvolver um padrão de morte por apoptose, enquanto que a necrose ocorre nas formas, na PA grave [115]. Por sua vez, a disfunção mitocondrial associada ao SO promove níveis de ATP desadequados dentro das células, levando à morte por necrose [115]. Associadas a este processo estão as alterações vasculares e microvasculares pancreáticas [257], uma vez que à medida que o SO progride, verifica-se um aumento da vasoconstrição, que conduz à redução da perfusão e consequente necrose do parênquima pancreático [258]. Os efeitos do SO não se limitam às células pancreáticas, uma vez que as ROS são libertadas para a circulação, ativando os leucócitos que também contribuem para a formação de ROS e outros mediadores inflamatórios [259]. A gravidade da PA está fortemente associada à SIRS, responsável pela elevada mortalidade na primeira semana de evolução do processo inflamatório pancreático [90]. As ROS são assim consideradas um fator de disfunção multiorgânica e de lesão tecidual extrapancreática [259].

Neste estudo recorreu-se à análise dos níveis de ROS, das defesas antioxidantes e da função mitocondrial. Estes parâmetros foram comparados entre os animais com PA e o grupo controlo, e na aplicação do *score* histológico de gravidade da PA.

A peroxidação lipídica foi avaliada através da atividade do HNE, um dos seus produtos mais bioativo e estável [260]. Atualmente é considerado o melhor marcador da peroxidação lipídica, sendo produzido em resposta à lesão tecidual e à inflamação induzidas pelas ROS, processos que se verificam na PA [261,262]. No presente estudo, observou-se uma elevação significativa dos níveis de HNE nos modelos murinos de PA ( $p < 0.001$ ), expressando a peroxidação lipídica na fase precoce do processo inflamatório pancreático. Quando se analisou a sua expressão no *score* de gravidade, verificou-se um aumento significativo entre a PA moderada e a grave ( $p < 0.01$ ). Os resultados obtidos, conjuntamente com a sua estabilidade, fazem do HNE um promissor biomarcador do SO de diagnóstico e de prognóstico da PA.

A nitração das proteínas foi avaliada pelo 3-NO, um marcador do stresse nitrosativo, passível de ser quantificado, estando também descrito como um marcador estável do SO em várias condições inflamatórias [263,264], nomeadamente na PA [265]. No presente estudo, verificou-se uma elevação dos níveis de 3-NO nos modelos murinos de PA ( $p < 0.01$ ), comprovando-se o SO e o stresse nitrosativo na PA. No *score* de gravidade de PA, verificou-se um aumento da sua expressão entre a PA ligeira e a grave ( $p < 0.05$ ). O 3-NO, através dos resultados obtidos, pode ser considerado como um promissor biomarcador do SO de diagnóstico e de prognóstico da PA.

Neste estudo também foi avaliada a carbonilação das proteínas como um biomarcador de oxidação proteica [266], recorrendo-se ao DNPH, passível de ser quantificado [266]. No presente estudo, foi verificado um aumento entre o modelo A e o grupo controlo ( $p < 0.01$ ). De acordo com os resultados obtidos, a carbonilação das proteínas pode ser um promissor biomarcador de diagnóstico da PA.

No sentido de se caracterizar o papel e o comportamento das defesas antioxidantes na PA, foram analisados os níveis de várias enzimas antioxidantes.

A GR é um dos mais importantes antioxidantes celulares e a sua depleção pode ser observada na PA [267,268]. No presente estudo, verificou-se uma diminuição dos seus níveis entre o modelo B e o controlo ( $p < 0.05$ ), podendo ser considerada como um possível biomarcador de diagnóstico da PA.

Os níveis de GPx também se encontram diminuídos no processo inflamatório pancreático, tendo sido descrita uma diminuição mais acentuada nas formas mais graves de PA, fazendo deste antioxidante um possível marcador de prognóstico [269]. No presente estudo, observou-se uma diminuição dos seus níveis entre o modelo B e o controlo ( $p < 0.05$ ) e uma diminuição entre a PA ligeira e a grave ( $p < 0.05$ ). A GPx, através dos resultados

obtidos, pode ser considerada como um promissor biomarcador do SO de diagnóstico e de prognóstico da PA.

A CAT degrada o  $H_2O_2$  produzido pelas oxidases peroxissômicas em  $H_2O$  e  $O_2$  [270]. No presente estudo, constatou-se uma diminuição dos seus níveis entre os modelos murinos de PA e o grupo controlo ( $p < 0.01$ ), entre os dois modelos estudados (modelo A:  $p < 0.05$  e modelo B:  $p < 0.01$ ). Estes resultados fazem da CAT um possível biomarcador de diagnóstico.

A SOD é uma das enzimas mais importantes que converte o anião superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . No presente estudo não se verificaram alterações dos seus níveis nos modelos murinos de PA ( $p > 0.05$ ). Tasci *et al.* [271], ao avaliarem o SO na fase precoce da PA grave, verificaram que os níveis de SOD não sofreram alterações significativas neste período. Os autores justificaram esta observação pela resposta mais tardia da SOD no SO.

A vitamina A é uma molécula lipossolúvel representada por uma cadeia lateral de polieno, um anel cíclico e um grupo final polar. Vitamina A é um termo genérico aplicado a componentes com atividade biológica do retinol ou de seus metabolitos. Está relacionada com vários mecanismos biológicos, como diferenciação celular, crescimento e migração de células imunes, atividade anti-inflamatória e SO [272]. No presente estudo, observou-se uma diminuição dos seus níveis entre os modelos murinos de PA e o grupo controlo ( $p < 0.01$ ) e no modelo B ( $p < 0.01$ ). A vitamina A pode ser considerada como um promissor biomarcador de diagnóstico da PA.

A vitamina E tem sido descrita como um importante lipossolúvel antioxidante, sendo um protetor quer da oxidação lipídica, quer proteica [273]. No presente estudo, constatou-se uma diminuição dos seus níveis entre o modelo B e o grupo controlo ( $p < 0.01$ ), fazendo deste antioxidante um eventual biomarcador de diagnóstico da PA.

No entanto, a interpretação destes resultados deve ser cautelosa, pois a regulação da atividade antioxidante depende de vários fatores, nomeadamente de cada órgão especificamente e da quantidade de cofatores presentes.

Assumindo o papel de principal organelo na síntese de ATP e fornecimento de energia, a disfunção mitocondrial tem sido implicada na morte da célula acinar durante a PA [253] e um regulador central da morte celular [51,102]. A lesão mitocondrial nas células acinares, resultante da sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , resulta na perda do PMM e na capacidade de gerar ATP, que geralmente é acompanhada pela produção maciça de ROS, apoptose e necrose celular e na geração e disseminação de mediadores inflamatórios [253]. As ROS geradas pela disfunção mitocondrial vão lesar as células acinares ao nível dos lípidos e das proteínas intracelulares [274]. O PMM é fundamental para manter a função fisiológica da



cadeia respiratória para gerar ATP [35,275]. Neste estudo, e com base no trabalho realizado por Song *et al.* [215] que descreveram a presença de mitocôndrias no sangue periférico e no plasma, bem como nos estudos efetuados por Geng *et al.* [216] e Chakraborty *et al.* [217] que recorreram à sonda JC1 para avaliação da função mitocondrial em sangue periférico, verificou-se a existência de disfunção mitocondrial nos modelos murinos de PA ( $p < 0.001$ ) e em cada modelo individualizado (modelo A:  $p < 0.01$  e modelo B:  $p < 0.001$ ) quando comparados com o grupo controle. Os resultados obtidos fazem da razão JC1 um possível biomarcador de diagnóstico da PA. No entanto, estes resultados devem ser interpretados com cuidado, uma vez que necessitam de mais validação.

O aumento dos níveis das ROS, a diminuição das defesas antioxidantes e a disfunção mitocondrial que se verificaram neste trabalho, acompanham o aumento da PCT, indicando que o SO tem um papel fundamental na patogênese da PA nos modelos murinos que mimetizam a PA de etiologia litiásica. Quando se avaliou o *score* histológico de gravidade de PA proposto, verificaram-se alterações mais significativas para o grupo de PA grave. Uma vez que o *score* histológico de gravidade da PA foi proposto tendo em conta diferentes modelos murinos, pode ser uma mais valia para futuros estudos experimentais, nomeadamente na avaliação da gravidade da PA e no desenvolvimento de novas terapias alvo.

## 5.2. Estudo Clínico

A PA está associada a um elevado número de internamentos e a um alto custo económico [29,276], principalmente quando se apresenta ou progride para PA grave, com uma elevada mortalidade justificada pela progressão da resposta inflamatória aguda, para SIRS ou falência multiorgânica [37]. No entanto, a resposta individual à lesão pancreática é altamente variável e, na maioria dos casos, imprevisível [277]. Por esta razão, a estratificação da gravidade da PA torna-se crucial, não só para a melhoria dos resultados clínicos, mas também da razão custo-benefício.

A gravidade da PA pode ser avaliada tendo por base fatores clínicos, laboratoriais, imagiológicos e *scores* multifatoriais, alguns obtidos na admissão enquanto outros às 48 horas ou mais tarde [75]. O marcador de prognóstico ideal deve ser de obtenção rápida, reproduzível, barato e de alta acuidade [278]. A identificação precoce dos doentes com PA grave, através de um biomarcador é fundamental para uma abordagem efetiva e obtenção de bons resultados clínicos. Infelizmente, não existe ainda, um marcador com uma alta acuidade para a gravidade da PA.

Neste sentido, foi desenvolvido um estudo clínico no sentido de, em primeiro lugar, avaliar o processo inflamatório e identificar novos marcadores de fase aguda ou validar marcadores de prognóstico já associados à PA. Em segundo lugar, e uma vez analisado, no modelo animal, o envolvimento do SO na fisiopatologia e progressão da PA, foi proposta a caracterização do SO numa amostra de doentes com PA litiásica para identificar possíveis marcadores de prognóstico deste processo inflamatório. Por último, e com o recurso à metabolómica, pretendeu-se identificar novos metabolitos como marcadores de prognóstico da PA.

A população incluída neste estudo é composta exclusivamente de doentes com PA litiásica, uma vez que é a causa mais frequente de PA nos países mediterrâneos, incluindo Portugal [30]. Esta escolha justificou-se também, devido ao número reduzido de estudos dirigidos a este subtipo de população de doentes [43]. A identificação precoce da gravidade da PA litiásica é ainda mais importante, principalmente nas primeiras 48 horas, uma vez que este período é considerado crucial para se definir a abordagem terapêutica a adotar [279]. Os doentes foram submetidos a US abdominal para confirmação da etiologia litiásica e naqueles com dúvida etiológica após a US, recorreu-se à EUS, que permitiu o estudo mais pormenorizado da vesícula biliar, para confirmação de microlitíase e da árvore biliar, num contexto de coledocolitíase [125,280].

Neste estudo foram avaliados os vários marcadores serológicos, calculadas razões com base em alguns desses marcadores e *scores* multifatoriais, tanto na admissão como às 48 horas [9]. Na admissão, relativamente à gravidade da PA, o BUN (0.888), neutrófilos (0.852) e leucócitos (0.829) foram os marcadores que apresentaram melhor poder preditivo. Quando se analisou a mortalidade, os marcadores com melhor poder preditivo foram os neutrófilos (0.906), leucócitos (0.886) e BUN (0.796). Às 48 horas, quando se analisou o poder preditivo para a gravidade da PA, foram identificados a hepcidina (0.997), NLR (0.913) e SIRI (0.904) com os melhores valores. Por sua vez, para a mortalidade os marcadores com maior poder preditivo foram a NLR (0.962), hepcidina (0.953), neutrófilos (0.941), LDH (0.932), PCR (0.928) e SIRI (0.913).

A elevação dos níveis séricos dos leucócitos é observada como resposta fisiológica a várias reações inflamatórias, incluindo a PA [25]. Diversos estudos descrevem os leucócitos como um bom marcador para a gravidade da PA na admissão, sendo incluído em vários *scores* multifatoriais, nomeadamente a SIRS [194]. Ünal *et al.* [281], para um *cutoff* de  $\geq 15.20 \times 10^3/\mu\text{L}$ , verificaram uma sensibilidade e especificidade de 67% e 88%, respetivamente. Mayer *et al.* [178], concluíram que os leucócitos são um bom discriminador, na admissão, entre a PA ligeira e grave. No entanto, Farkas *et al.* [282], verificaram que tanto na admissão, como nas primeiras 24 horas de início dos sintomas, os leucócitos não

apresentaram valor preditivo para a gravidade e mortalidade da PA, evidenciando a natureza contraditória dos resultados obtidos. No presente estudo, para um *cutoff* de  $\geq 14.89 \times 10^3/\mu\text{L}$ , verificou-se uma sensibilidade, especificidade e acuidade de 91%, 77% e 80%, respectivamente, confirmando, como a maioria dos estudos referidos, o valor preditivo na gravidade da PA, na admissão. Às 48 horas, para um *cutoff* de  $\geq 12.09 \times 10^3/\mu\text{L}$  a sensibilidade, especificidade e acuidade foram de 91%, 81% e 78%, respectivamente. Estes resultados demonstram o papel dos leucócitos como marcadores de gravidade em doentes com PA litiásica, sendo uma ferramenta de fácil acesso na prática clínica.

Os neutrófilos são células inflamatórias potentes que atuam na primeira linha de defesa imune contra o processo inflamatório [283,284]. Possuem a capacidade de enviar sinais para outras células imunes inatas, como as células epiteliais, mastócitos, macrófagos e células endoteliais vasculares [285]. No presente estudo verificou-se uma elevação dos níveis de neutrófilos na PA grave tanto na admissão como às 48 horas. Na admissão, para um *cutoff* de  $\geq 13.31 \times 10^3/\mu\text{L}$ , a sensibilidade, especificidade e acuidade foram de 91%, 81% e 82%, respectivamente e às 48 horas, para um *cutoff* de  $\geq 10.64 \times 10^3/\mu\text{L}$  obtiveram-se uma sensibilidade de 91%, especificidade de 83% e acuidade de 82%. Estes resultados sugerem que os neutrófilos podem ser considerados como uma ferramenta de prognóstico da PA litiásica, acessível em ambiente clínico.

No entanto, foi evidenciado que as razões calculadas a partir de parâmetros constituintes do hemograma refletem melhor a resposta inflamatória sistêmica, como a NLR, a PLR e o SIRI, este último, estando associado à resposta inflamatória sistêmica, mas descrito em contexto de doença oncológica [281,284,286].

A NLR permite a medição da resposta inflamatória sistêmica, uma vez que representa o contraste de duas vias imunes complementares [25]. Os neutrófilos, são a principal célula responsável pela resposta inflamatória não-específica e o principal iniciador da cascata destrutiva tecidual. Por sua vez, a resposta imune linfocitária ocorre mais tardiamente e a sua principal função é mediar e resolver o processo inflamatório não-específico. A divergência destes dois componentes do hemograma, nomeadamente a neutrofilia e linfopenia, contribuíram para que esta razão fosse proposta como uma ferramenta de prognóstico da PA, com melhor valor preditivo do que cada constituinte isolado [194]. Azab *et al.* [283], avaliaram o valor preditivo da NLR na admissão em UCI e descreveram, para um *cutoff* de  $\geq 4.7$ , uma sensibilidade e especificidade de 85.2% e 47.7%, respectivamente, sendo um marcador mais estável que os níveis séricos de leucócitos. Gülen *et al.* [287], demonstraram uma associação entre os níveis elevados de NLR e a mortalidade da PA nas primeiras 24 horas. Kaplan *et al.* [198], descreveram para um *cutoff* de  $\geq 13.64$  uma sensibilidade de 73% e especificidade de 82.7% para a gravidade da PA. No presente

estudo, na admissão, verificou-se, para um *cutoff* de  $\geq 14.64$ , uma sensibilidade, especificidade e acuidade de 82%, 67% e 73%, enquanto que, às 48 horas, para um *cutoff* de  $\geq 10.90$  a sensibilidade foi de 82%, especificidade de 85% e a acuidade de 80%. Na avaliação do valor preditivo para a mortalidade por PA, foi observado, às 48 horas, que a NLR apresentou a melhor AUC. Sendo um marcador fácil de calcular, repetível, baseado no simples hemograma, e conseqüentemente barato, poderá ser uma ferramenta interessante de uso na prática clínica isolada ou incorporada, em *scores* multifatoriais.

O SIRI foi inicialmente descrito para o estudo da inflamação relacionada com o cancro [25,288]. Este índice relaciona os níveis de neutrófilos, monócitos e linfócitos de doentes com cancro e respetivo prognóstico e foi aplicado na avaliação da resposta à terapia sistémica adotada [288-290]. Este índice reflete o estado da resposta imune local e sistémica [286], sendo definido pela fórmula:  $SIRI = N \times M \div L$ , onde N representa os neutrófilos, M os monócitos e L os linfócitos [288]. O *cutoff* descrito para este índice, tendo por base a análise da resposta à quimioterapia (QT), foi  $\geq 2.3$  [289]. No presente estudo, o SIRI apresentou alterações significativas na avaliação da gravidade da PA litiásica às 48 horas ( $p < 0.001$ ). Para um *cutoff* de  $\geq 7.14$  foi observada uma sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade de 82%, 87%, 53%, 96% e 85%, respetivamente. Quando o valor preditivo para a mortalidade foi avaliado, às 48 horas de início dos sintomas, verificou-se uma AUC de 0.953. Trata-se do primeiro estudo que avalia a aplicabilidade deste índice num processo inflamatório benigno, como é PA, podendo justificar a diferença do *cutoff* descrito pelos autores para a patologia maligna. Os resultados obtidos apontam o SIRI como um biomarcador com alto valor preditivo às 48 horas, utilizando apenas valores obtidos no hemograma, permitindo a monitorização contínua e sendo de fácil aplicabilidade na prática clínica.

A PLR tem sido descrita como uma ferramenta que permite a medição da resposta inflamatória sistémica [291,292]. As plaquetas apresentam um papel importante quer na hemostase, quer na resposta imune, no contexto de processos inflamatórios e na disfunção microvascular. Os linfócitos estão envolvidos na resposta imune adaptativa [293]. Zhou *et al.* [199], verificaram para um *cutoff* de  $\geq 169.29$ , uma AUC de 0.621. No presente estudo, ao contrário do verificado por alguns autores, foi verificada a alteração com significado estatístico para a avaliação da PA às 48 horas ( $p < 0.05$ ). Para um *cutoff* de  $\geq 187.8$ , a sensibilidade, especificidade e acuidade foram de 73%, 65% e 70%, respetivamente. Por esta razão, a PLR pode ser considerada também como uma ferramenta com um valor preditivo para a gravidade da PA litiásica embora com menor poder que a NLR e SIRI.

Um aumento do nível sérico de BUN, na admissão em doentes com PA, pode ser secundário à azotemia pré-renal associada à hipovolemia inicial, constituindo um estado do

balanço negativo de nitrogénio contínuo, relacionado com o aumento do catabolismo proteico, induzido pela inflamação e pelo comprometimento da função renal. Dois grandes estudos mostraram que um nível elevado de ureia na admissão é um fator de risco independente para mortalidade na PA [137,294]. No presente estudo, verificou-se que na admissão o BUN, para um *cutoff* de  $\geq 27.3$ mg/dL mostrou uma sensibilidade, especificidade e acuidade de 82%, 88% e 82%, respetivamente. Às 48 horas, para um *cutoff* de  $\geq 26.6$ mg/dL foi observada uma sensibilidade de 73%, especificidade de 92% e acuidade de 89%. Estes resultados sugerem que o BUN pode ter utilidade como marcador de prognóstico da PA.

O envolvimento renal tem sido frequentemente observado no decorrer da PA [295], estando associado à elevação da creatinina. A insuficiência renal foi relacionada com o desenvolvimento de necrose pancreática, podendo a creatinina, ser considerada como ferramenta de prognóstico da PA [296]. No presente estudo constatou-se, às 48 horas, que a creatinina apresentou alterações com significado estatístico ( $p < 0.01$ ). Para um *cutoff* de  $\geq 0.85$ mg/dL apresentou uma sensibilidade, especificidade e acuidade de 73%, 65% e 67%, respetivamente. A creatinina, sendo um marcador usado na prática clínica, pode ser uma possível ferramenta de prognóstico da PA.

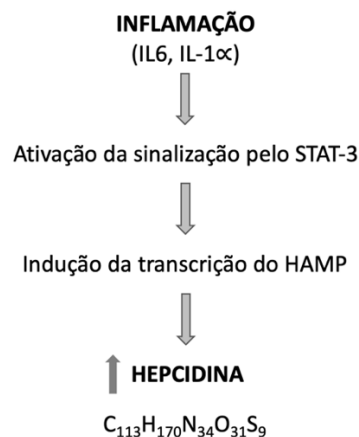
A LDH é uma enzima citoplasmática amplamente expressa em vários tecidos. A elevação dos seus níveis é observada em várias patologias, nomeadamente na lesão tecidual, necrose, hipoxia, inflamação e malignidade [297]. É também considerada um marcador de morte celular, podendo ser associada à necrose pancreática [298]. Chen *et al.* [299], descreveram a LDH como um marcador de prognóstico da PA. No presente estudo, às 48 horas, a LDH apresentou alterações significativas para a gravidade da PA ( $p < 0.01$ ). Assim, para um *cutoff* de  $\geq 521$ U/L, observou-se uma sensibilidade, especificidade e acuidade de 91%, 75% e 76%, respetivamente, podendo ser considerada como uma ferramenta de prognóstico da PA, com fácil aplicabilidade na prática clínica.

A PCT tem sido descrita como uma ferramenta que permite a avaliação da resposta inflamatória sistémica [174]. Este biomarcador é libertado pelos hepatócitos, monócitos periféricos e células C da tiróide. Um aumento dos níveis de PCT tem sido observado na PA grave, necrose pancreática e falência de órgão [146]. Brunkhorst *et al.* [300], descreveram uma diferença significativa entre doentes com PA litiásica e de outras etiologias. Mofidi *et al.* [186], numa revisão sistemática, utilizando o *cutoff* de  $\geq 0.5$ ng/mL descreveram uma sensibilidade de 73% e especificidade de 87% para a gravidade da PA, com uma AUC de 0.88. No presente estudo, na admissão, para um *cutoff* de  $\geq 0.58$ ng/mL foi descrita uma sensibilidade de 73%, especificidade de 65%, com uma AUC de 0.745. Às 48 horas, para um *cutoff* de  $\geq 2.83$ ng/mL observou-se uma sensibilidade de 64%, especificidade de 75%, com

uma AUC de 0.754 para a gravidade da PA litiásica. Estes resultados sugerem a sua aplicabilidade como marcador de prognóstico tanto na admissão como às 48 horas após o início dos sintomas, embora não seja um parâmetro analítico aplicado habitualmente na prática clínica.

A PCR é uma proteína de fase aguda, descrita como uma ferramenta de valor preditivo para o prognóstico e mortalidade da PA [75]. O *cutoff* aceite, como valor preditivo de gravidade da PA é  $\geq 150$ mg/mL às 48 horas, com sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 80%, 75%, 67% e 86%, respetivamente [301]. No presente estudo, a PCR foi avaliada às 48 horas. Para o *cutoff* definido observou-se uma sensibilidade, especificidade, VPN e acuidade de 100%, 62%, 100% e 67%, respetivamente. Este marcador é o geralmente aceite, apresentando-se como uma ferramenta de fácil acesso, baixo custo e com aplicabilidade na prática clínica.

A hepcidina foi descrita por Krause *et al.* [302] como um peptídeo antimicrobiano expresso no fígado (LEAP-1, do inglês *liver-expressed antimicrobial peptide*). Em 2001, Park *et al.* [303], identificaram-no na urina e atribuíram-lhe a sua designação definitiva de hepcidina. A hepcidina é uma hormona peptídica com 25 aminoácidos, responsáveis pela regulação da hemostase do ferro. O gene da hepcidina (HAMP, do inglês *hepcidin antimicrobial peptide*), encontra-se no cromossoma 19. A principal fonte da síntese de hepcidina é o fígado, no entanto, foi descrita produção extra-hepática no coração, rins, retina, monócitos e macrófagos, células alveolares, adipócitos, células  $\beta$  do pâncreas e bÍlis [191,304,305]. Os seus níveis aumentam durante a inflamação como resultado do aumento da IL-6, pela ativação do sinal de transdução e da transcrição-3 (STAT-3, do inglês *signal transducer and activator of transcription-3*) tal como esquematizado na figura 5.1 [189].



**Figura 5.1** – Síntese de hepcidina no processo inflamatório. A ativação do STAT-3 requer a presença de SAMD-4 uma vez que a sua ausência previne a expressão do gene da hepcidina mediada pelo STAT-3. Publicado em Silva-Vaz *et al.* 2020 [25]. IL: interleucina; STAT-3: do inglês *signal transducer and activator of transcription-3*; HAMP: do inglês *hepcidin antimicrobial peptide*.

No processo inflamatório, os macrófagos são estimulados, ativando uma rede de citocinas, nomeadamente a IL-6, um dos principais indutores da expressão da hepcidina. Um aumento dos níveis de hepcidina conduz a uma diminuição dos níveis de ferro, devido à inibição da sua libertação pelos macrófagos, bem como a sua absorção intestinal. No processo inflamatório, a regulação da produção hepcidina é realizada pela estimulação de IL-6 [306]. Uma vez que a hepcidina é sintetizada no pâncreas e sistema biliar, pode ser considerada como um marcador de inflamação específico na PA, tornando-o num marcador com características únicas. No presente estudo, às 48 horas, a hepcidina mostrou ser o marcador com valor preditivo mais potente para a gravidade da PA litiásica, uma vez que, para um *cutoff* de  $\geq 154.7$  ng/mL, observou-se uma sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acuidade de 100%, 96%, 86%, 100% e 97%, respetivamente. Quando avaliada a mortalidade, às 48 horas, apresentou uma AUC de 0.953. Estes resultados mostram que a hepcidina é um marcador melhor que a PCR, sendo uma possível ferramenta de prognóstico a adotar na prática clínica.

Relativamente aos *scores* multifatoriais de prognóstico, foram avaliados o BISAP, SIRS e MMS, pela facilidade de uso na prática clínica e pelos vários estudos publicados com a sua avaliação no prognóstico de gravidade da PA.

O BISAP foi proposto como um *score* simples de utilizar com dados clínicos, facilmente disponíveis na admissão e nas primeiras 48 horas [137]. Vários estudos validaram o desempenho do BISAP como ferramenta preditiva de gravidade da PA [24,307]. No presente estudo, o BISAP mostrou, na admissão, uma AUC de 0.724 e às 48 horas, uma AUC de 0.926. Quando se analisou a sensibilidade, especificidade e acuidade, na admissão e às 48 horas, para um *cutoff*  $\geq 3$ , verificou-se 46%, 85% e 88% e 85%, 81% e 85%, respetivamente. Este *score* apresentou melhor valor preditivo às 48 horas. Devido à sua facilidade na utilização e no cálculo, deve ser preconizado na prática clínica.

O SIRS é simples e amplamente usado em ambiente clínico, sendo uma ferramenta importante de avaliação dos distúrbios sistémicos. Se SIRS presente ( $\geq 2$ ) e persistente às 48 horas após a admissão, associa-se um risco aumentado de desenvolvimento de disfunção multiorgânica, determinada pelo MMS [9]. No presente estudo, tanto o SIRS como o MMS apresentaram um valor preditivo às 48 horas. Para um *cutoff* comum  $\geq 2$  apresentaram sensibilidade, especificidade e acuidade de 77%, 85% e 82% e 90%, 81% e 89%, respetivamente. São ferramentas úteis de avaliação de gravidade da PA às 48 horas, uma vez que é neste período de tempo que se define a persistência de falência de órgão.

Nos eventos iniciais da PA, foi demonstrado que o SO desempenha um importante papel, uma vez que as ROS causam danos oxidativos diretos nos lípidos e nas proteínas e

modulam os fatores de transcrição e as vias de transdução [70]. Uma vez produzidas, as ROS podem atuar como moléculas alvo no processo inflamatório pancreático quer na sua manutenção, quer na progressão do processo inflamatório e mesmo no desenvolvimento de complicações extrapancreáticas [249].

Neste estudo foi observado o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, nitração e carbonilação proteica entre o grupo controlo e os doentes com PA litiásica. Estes achados fornecem mais evidências do papel do SO como mediador, logo desde a fase inicial do processo inflamatório pancreático. Os resultados obtidos colocam o HNE, o 3-NO e os níveis de carbonilação proteica como marcadores de diagnóstico, uma vez que se observaram alterações entre o grupo controlo e os doentes com PA ( $p < 0.01$  para as três ROS em estudo), apoiando o envolvimento das ROS no processo inflamatório pancreático. Quando analisadas as diferenças entre os diferentes graus de gravidade, verificou-se que a peroxidação lipídica apresentou diferenças entre PA leve e a grave ( $p < 0.01$ ) e entre a PA moderadamente severa e a grave ( $p < 0.05$ ) e a nitração entre a PA ligeira e grave ( $p < 0.05$ ). A peroxidação lipídica pode estar associada aos grânulos citosólicos primários dos PMN e ao processo inflamatório [88]. Os produtos da peroxidação lipídica também podem, por sua vez, estar associados a lesões da membrana, à inativação dos recetores e enzimas ligados à membrana, resultando em danos celulares. Estes produtos, principalmente o HNE, reagem com proteínas, alterando a sua conformação e função, levando à resposta inflamatória [308]. Relativamente ao prognóstico de gravidade da PA, só o HNE e o 3-NO se mostraram promissores.

O processo inflamatório agudo pancreático também tem sido associado ao declínio das defesas antioxidantes, incluindo os níveis da GR, GPx, CAT e SOD [309]. No presente estudo verificou-se que a GR ( $p < 0.05$ ), CAT ( $p < 0.05$ ) e SOD ( $p < 0.001$ ) apresentaram uma diminuição dos seus níveis entre doentes com PA e controlos. Estas enzimas são componentes do sistema antioxidante celular. A atividade prematura das proteases desempenha, também, um importante papel na patogénese da PA [310]. De salientar que a GPx e SOD evidenciaram diminuição da sua atividade, nos diferentes graus de gravidade: a GPx entre a PA leve e a grave. ( $p < 0.05$ ) e a SOD entre PA leve e a moderadamente grave ( $p < 0.001$ ) e a PA ligeira e a grave ( $p < 0.001$ ). Estes achados são consistentes com estudos anteriores, nos quais foi verificada uma diminuição na expressão das enzimas antioxidantes, tanto em modelos murinos, quanto em doentes com AP [261,265]. Além disso, a diminuição das defesas antioxidantes pode explicar o aumento da peroxidação lipídica em doentes com PA grave. Assim, os dados também apoiam que os diferentes graus de gravidade da PA estão associados ao SO, constatando-se que a PA grave está associada a uma menor atividade das enzimas antioxidantes, favorecendo a lesão celular das ROS. Os



dados obtidos colocam como possíveis biomarcadores de diagnóstico a GR, CAT e SOD e como biomarcadores ao prognóstico de gravidade da PA, só a GPx e a SOD se mostraram promissores.

As mitocôndrias compreendem a fonte intracelular de energia das células e, simultaneamente, desempenham um papel importante no SO. Estes organelos, assumem, também, um papel relevante na fisiopatologia da PA [103]. O estudo da sua função pode fornecer uma via indireta de avaliação da lesão pancreática [311]. No presente estudo, verificou-se uma diminuição da razão JC1 entre os doentes com PA litiásica e os controlos ( $p < 0.001$ ) e entre a PA leve e a grave ( $p < 0.01$ ). A disfunção mitocondrial é observada nas células acinares ao longo de vários estímulos no pâncreas resultantes do processo inflamatório [54]. Esta disfunção conduz a um estado de baixa energia devido à depleção de ATP, estando associada ao principal mecanismo da pancreatite, a ativação do tripsinogénio. Esta condição pode ser responsável pela necrose acinar e lesão pancreática aguda grave [54]. Além disso, a disfunção mitocondrial está associada ao SO [312]. Este estudo levanta a hipótese da relação entre a disfunção mitocondrial, o aumento do dano induzido pelo SO e a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Os achados deste estudo corroboram os resultados obtidos na avaliação dos marcadores inflamatórios estudados, nomeadamente a elevação da LDH, enzima citosólica que é libertada nos eventos de morte celular por necrose [313], processo característico das formas graves de PA. Neste estudo, a razão JC1 mostrou-se tanto com valor de biomarcador de diagnóstico, como de prognóstico de gravidade da PA litiásica. No entanto, ressalva-se a necessidade de validação destes resultados, com a avaliação de outras amostras sanguíneas e de outras técnicas de avaliação da função mitocondrial.

Tal como se verificou no estudo pré-clínico, o SO originado pelo desequilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes, tendendo para o aumento das primeiras e diminuição das segundas, foi observado na fase precoce da PA, apoiando o papel fundamental que assume no processo inflamatório pancreático.

A metabolómica é uma análise rápida e não invasiva que consiste no estudo sistemático de metabolitos, que representam o fenótipo funcional de uma determinada célula, tecido ou organismo [314]. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem uma disfunção associada ao processo inflamatório pancreático, tendo sido aplicada a metabolómica baseada na RMN, para a caracterização do plasma de doentes com PA litiásica. Em relação ao diagnóstico de PA esta técnica identificou alterações em diferentes moléculas nomeadamente da valina ( $p < 0.001$ ), isoleucina ( $p < 0.001$ ), leucina ( $p < 0.001$ ), treonina ( $p < 0.001$ ), glutamina ( $p < 0.001$ ), glicose ( $p < 0.05$ ), malato ( $p < 0.01$ ), lípidos ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ ) e acetona ( $p < 0.05$ ) nos doentes com PA, quando comparados com o

grupo controlo, evidenciando que doentes com PA apresentam alterações sistémicas no seu perfil metabólico. As concentrações no plasma dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) estão diminuídas nos doentes com PA. Esta observação foi também descrita por Villaseñor *et al.* [208], sendo muito relevante uma vez que estes aminoácidos são componentes do suco pancreático e a diminuição da sua concentração, na circulação pode estar relacionada com a insuficiência pancreática exócrina, característica da PA grave. Neste sentido, podem ter um papel de biomarcadores para a identificação precoce do processo inflamatório pancreático. A glutamina é um elemento crucial no ciclo do ácido tricarboxílico, uma importante via para a obtenção de energia primária para a maioria dos organismos [315]. Neste estudo, a concentração no plasma de glutamina encontra-se diminuída, sugerindo que a PA inibe a metabolização deste substrato reprimindo o metabolismo energético num determinado nível. A concentração de malato no plasma encontra-se também alterada nos doentes com PA. Este metabolito é um produto da decomposição de carboidratos, através do ciclo do ácido tricarboxílico, para fornecer energia adicional na forma de fosfato de adenosina [316]. Neste estudo, o aumento dos níveis de malato no plasma dos doentes com PA litiásica, sugere um aumento da demanda por energia, devido ao processo inflamatório pancreático e sistémico.

Na avaliação do prognóstico da PA verificou-se que os metabolitos como a treonina e a fenilalanina e o conteúdo lipídico apresentaram alterações no plasma entre os diferentes graus de gravidade da PA. Relativamente ao conteúdo lipídico, é importante salientar que não foi possível determinar nem a estrutura e nem o grupo a que os lípidos identificados pertencem, sendo necessário realizar, posteriormente, o estudo da lipidómica, no sentido de caracterizar em detalhe as diferenças encontradas. No entanto, o metabolismo lipídico pode causar SO e acidose, levando à lesão do pâncreas, tecidos circundantes e necrose por hipóxia, características observadas na forma grave de PA [317]. No presente estudo, foram também observados níveis plasmáticos diminuídos de treonina, entre doentes com PA ligeira e moderadamente grave ( $p < 0.05$ ). Estes níveis de treonina estão associados a alterações nas citocinas inflamatórias, sendo esta observação mais proeminente na resposta imune intestinal [318]. Na PA, alterações na imunidade intestinal podem estar associadas à translocação bacteriana e à presença de infeção pancreática secundária, que ocorre principalmente nas formas graves da PA. A fenilalanina é um aminoácido fortemente associado à mortalidade em doentes com sepsis grave [319]. Neste estudo, os níveis plasmáticos de fenilalanina foram mais altos nos doentes com PA grave, em comparação com os doentes com PA leve ( $p < 0.05$ ). Este aminoácido pode ser considerado como um marcador prognóstico para PA grave.

Os resultados obtidos demonstram que a PA litiásica promove alterações no metabolismo pancreático a nível molecular, e sugerem que alguns dos metabolitos identificados podem ser potenciais marcadores, quer para o diagnóstico de PA, quer para o prognóstico do processo inflamatório. A caracterização do perfil metabolómico, no presente estudo, permitiu a identificação de várias vias metabólicas no pâncreas, afetadas pela PA.

Apesar deste estudo apresentar algumas limitações que devem ser consideradas para a interpretação dos resultados obtidos, sendo a mais importante o tamanho da amostra, possibilitaram a identificação, pela primeira vez, do SIRI como uma nova ferramenta de prognóstico de gravidade da PA e validaram a hepcidina e NLR, como marcadores de prognóstico melhores que a PCR como valor preditivo de gravidade da PA. Na análise do SO e na metabolómica no plasma de doentes com PA litiásica foram detetadas alterações que permitiram a identificação de alguns biomarcadores, quer de diagnóstico quer de prognóstico da PA.

Estes novos marcadores de prognóstico da gravidade da PA podem permitir a identificação precoce da falência multiorgânica e de necrose associada à PA, e antecipar medidas terapêuticas que possam minorar o risco de morbimortalidade, associada a este processo inflamatório agudo pancreático. Estes marcadores poderão, também, assumir um papel fundamental e relevante no desenvolvimento de eventuais novas terapias alvo.



## 6. Conclusão e perspectivas futuras

A avaliação precoce da gravidade da PA é um processo fundamental, principalmente na admissão, uma vez que é neste período que se vai definir a melhor abordagem terapêutica.

Neste estudo translacional pretendeu-se aprofundar o conhecimento da fisiopatologia da PA. Para isso avaliou-se o SO em dois modelos murinos de PA. Foi inicialmente proposto um *score* histológico de gravidade da PA, baseado nas observações histológicas de tecido pancreático e correlacionado com a PCT, um marcador inflamatório de fase aguda, tendo-se obtido uma correlação muito forte.

Quando se analisou o SO verificaram-se alterações nas ROS, nas defesas antioxidantes e no PMM, entre o grupo controlo e os modelos de PA. Quando se analisou o SO no *score* histológico foram observadas alterações nas ROS e nas defesas antioxidantes. Estas alterações confirmam o papel do SO no processo inflamatório pancreático, nos modelos animais e na sua gravidade.

Na avaliação do processo inflamatório pancreático em doentes com PA litiásica, na admissão foram identificados como possíveis marcadores de prognóstico o BUN, os leucócitos e a NLR. Por sua vez, às 48 horas, a hepcidina, a NLR e o SIRI apresentaram o melhor poder preditivo. Neste estudo, foi identificado, pela primeira vez, o SIRI com aplicabilidade no prognóstico da PA às 48 horas, sendo um marcador obtido apenas com dados do hemograma.

Na avaliação do SO, os resultados obtidos apoiam que os diferentes graus de gravidade da PA estão associados a um aumento da produção das ROS, diminuição das defesas antioxidantes e disfunção mitocondrial. Verificou-se que a PA grave induziu alterações na peroxidação lipídica, nitração das proteínas, GPx, SOD e razão JC1 que poderão ser usados como ferramentas de prognóstico da PA logo numa fase precoce.

Estes achados demonstram que o SO é um processo com um importante papel na patogénese e na progressão da PA e que a sua melhor compreensão poderá contribuir, não só para a identificação de novos biomarcadores de prognóstico, como também para novas terapias alvo.

A caracterização do perfil metabolómico permitiu, também, a identificação de várias vias metabólicas pancreáticas afetadas pela gravidade da PA litiásica. Verificou-se que a PA grave induziu alterações nos níveis de treonina, fenilalanina e dos lípidos que poderão ser usados como ferramentas de prognóstico da PA logo numa fase precoce.

Este estudo pretendeu ser um contributo na avaliação do prognóstico da PA pela compreensão do papel do SO e da disfunção mitocondrial na sua fisiopatologia e pela caracterização do perfil metabólico no plasma de doentes com PA de etiologia litiásica, permitindo identificar marcadores de prognóstico precoces de gravidade.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, este estudo levanta várias questões, que poderão ser o mote para o desenvolvimento de projetos de investigação, nomeadamente relacionados com os modelos murinos existentes e a aplicabilidade do *score* histológico, no complexo e multifatorial processo que é a PA, na compreensão do seu mecanismo fisiopatológico ou na identificação de novas terapias alvo; o desenvolvimento de novos *scores* multifatoriais ou a inclusão dos marcadores identificados neste trabalho, nomeadamente da hepcidina ou do SIRI, em *scores* pré-existentes, aumentando a sua robustez; e o desenvolvimento de técnicas ou *kits* de leitura rápida dos metabolitos identificados, quer pelo estudo do SO, quer pela metabolómica.

Covilhã, outubro de 2020

## 7. Bibliografia

1. Tulp, N. *Observationum medicarum Editio nova et actua* [Medical Observations. New and Enlarged Edition]. *Vol Book 4*.
2. Fitzgerald, P.J. Medical anecdotes concerning some diseases of the pancreas. *Monographs in pathology* **1980**, *21*, 1-29.
3. Pannala, R.; Kidd, M.; Modlin, I.M. Acute pancreatitis: a historical perspective. *Pancreas* **2009**, *38*, 355-366.
4. Rocha, F.G.; Balakrishnan, A.; Ashley, S.W.; Clancy, T.E. A historic perspective on the contributions of surgeons to the understanding of acute pancreatitis. *American journal of surgery* **2008**, *196*, 442-449.
5. Martins, O.F.A., P. A abordagem cirúrgica da pancreatite aguda grave. *Revista Portuguesa de Cirurgia* **2009**, *8*, 67-74.
6. Elman, R.; McCAUGHAN, J.M. The quantitative determination of blood amylase with the viscosimeter. *Archives of Internal Medicine* **1927**, *40*, 58-64.
7. Ranson, J.H.; Rifkind, K.M.; Roses, D.F.; Fink, S.D.; Eng, K.; Spencer, F.C. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* **1974**, *139*, 69-81.
8. Bradley, E.L. A clinically based classification system for acute pancreatitis: summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Archives of surgery* **1993**, *128*, 586-590.
9. Banks, P.A.; Bollen, T.L.; Dervenis, C.; Gooszen, H.G.; Johnson, C.D.; Sarr, M.G.; Tsiotos, G.G.; Vege, S.S. Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* **2013**, *62*, 102-111.
10. In't Veld, P.; Marichal, M. Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. *Advances in experimental medicine and biology* **2010**, *654*, 1-19.
11. Standring, S. *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*; Elsevier Health Sciences: 2015.
12. Moore, K.L.; Dalley, A.F.; Agur, A.M. *Clinically oriented anatomy*; Lippincott Williams & Wilkins: 2013.
13. Townsend, C.M.; Beauchamp, R.D.; Evers, B.M.; Mattox, K.L. *Sabiston Textbook of Surgery E-Book: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*; Elsevier Health Sciences: 2016.
14. Hagai, H. Configurational anatomy of the pancreas: its surgical relevance from ontogenetic and comparative-anatomical viewpoints. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* **2003**, *10*, 48-56.
15. Glaser, J.; Hogemann, B.; Paulus, H.; Lammers, U.; von Eiff, M.; van Husen, N.; Gerlach, U. [Primary sonographic diagnosis of pancreatic duct calculi: the non-uniform aspect]. *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* **1987**, *8*, 283-287.
16. Mourad, N.; Zhang, J.; Rath, A.M.; Chevrel, J.P. The venous drainage of the pancreas. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* **1994**, *16*, 37-45.

17. Love, J.A.; Yi, E.; Smith, T.G. Autonomic pathways regulating pancreatic exocrine secretion. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **2007**, *133*, 19-34.
18. Said, H.M. *Physiology of the gastrointestinal tract*; Academic Press: 2018.
19. Jamieson, J.D.; Palade, G.E. Synthesis, intracellular transport, and discharge of secretory proteins in stimulated pancreatic exocrine cells. *The Journal of cell biology* **1971**, *50*, 135-158.
20. Petersen, O.H. Specific mitochondrial functions in separate sub-cellular domains of pancreatic acinar cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **2012**, *464*, 77-87.
21. Pandol, S. The Exocrine Pancreas. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. *San Rafael (CA)* **2010**.
22. Benarroch-Gampel, J.; Boyd, C.A.; Sheffield, K.M.; Townsend, C.M., Jr.; Riall, T.S. Overuse of CT in patients with complicated gallstone disease. *Journal of the American College of Surgeons* **2011**, *213*, 524-530.
23. Criddle, D.N.; Booth, D.M.; Mukherjee, R.; McLaughlin, E.; Green, G.M.; Sutton, R.; Petersen, O.H.; Reeve, J.R., Jr. Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 exhibit similar actions on calcium signaling, zymogen secretion, and cell fate in murine pancreatic acinar cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **2009**, *297*, G1085-1092.
24. Hager, S.; Kumar, N. Evaluation of the BISAP scoring system in prognostication of acute pancreatitis - A prospective observational study. *International journal of surgery (London, England)* **2018**, *54*, 76-81.
25. Silva-Vaz, P.; Abrantes, A.M.; Morgado-Nunes, S.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Evaluation of Prognostic Factors of Severity in Acute Biliary Pancreatitis. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
26. Moynihan, B. ACUTE PANCREATITIS. *Ann Surg* **1925**, *81*, 132-142.
27. Spanier, B.W.; Dijkgraaf, M.G.; Bruno, M.J. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **2008**, *22*, 45-63.
28. Shah, A.P.; Mourad, M.M.; Bramhall, S.R. Acute pancreatitis: current perspectives on diagnosis and management. *Journal of inflammation research* **2018**, *11*, 77.
29. Silva-Vaz, P.; Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Murine Models of Acute Pancreatitis: A Critical Appraisal of Clinical Relevance. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, 2794.
30. Roberts, S.E.; Morrison-Rees, S.; John, A.; Williams, J.G.; Brown, T.H.; Samuel, D.G. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology* **2017**, *17*, 155-165.
31. Hamada, S.; Masamune, A.; Kikuta, K.; Hirota, M.; Tsuji, I.; Shimosegawa, T. Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan. *Pancreas* **2014**, *43*, 1244-1248.
32. Yadav, D.; O'Connell, M.; Papachristou, G.I. Natural history following the first attack of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* **2012**, *107*, 1096-1103.
33. Shen, H.N.; Lu, C.L. Incidence, resource use, and outcome of acute pancreatitis with/without intensive care: a nationwide population-based study in Taiwan. *Pancreas* **2011**, *40*, 10-15.
34. Ikeura, T.; Horibe, M.; Sanui, M.; Sasaki, M.; Kuwagata, Y.; Nishi, K.; Kariya, S.; Sawano, H.; Goto, T.; Hamada, T. Validation of the efficacy of the prognostic factor score in the Japanese



- severity criteria for severe acute pancreatitis: A large multicenter study. *United European gastroenterology journal* **2017**, *5*, 389-397.
35. Javed, M.A.; Wen, L.; Awais, M.; Latawiec, D.; Huang, W.; Chvanov, M.; Schaller, S.; Bordet, T.; Michaud, M.; Pruss, R. TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester-Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death. *Pancreas* **2018**, *47*, 18.
  36. Vege, S.; Chari, S. Etiology of acute pancreatitis. *UpToDate* **2015**, *17*.
  37. Trumbeckaite, S.; Kuliaviene, I.; Deduchovas, O.; Kincius, M.; Baniene, R.; Virketyte, S.; Bukauskas, D.; Jansen, E.; Kupcinskas, L.; Borutaite, V., et al. Experimental acute pancreatitis induces mitochondrial dysfunction in rat pancreas, kidney and lungs but not in liver. *Pancreatology* **2013**, *13*, 216-224.
  38. van Santvoort, H.C.; Bakker, O.J.; Bollen, T.L.; Besselink, M.G.; Ahmed Ali, U.; Schrijver, A.M.; Boermeester, M.A.; van Goor, H.; Dejong, C.H.; van Eijck, C.H., et al. A conservative and minimally invasive approach to necrotizing pancreatitis improves outcome. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1254-1263.
  39. Jupp, J.; Fine, D.; Johnson, C.D. The epidemiology and socioeconomic impact of chronic pancreatitis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **2010**, *24*, 219-231.
  40. Cappell, M.S. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Medical Clinics of North America* **2008**, *92*, 889-923.
  41. Leppaniemi, A.; Tolonen, M.; Tarasconi, A.; Segovia-Lohse, H.; Gamberini, E.; Kirkpatrick, A.W.; Ball, C.G.; Parry, N.; Sartelli, M.; Wolbrink, D., et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis. *World journal of emergency surgery : WJES* **2019**, *14*, 27.
  42. Gurusamy, K.S.; Nagendran, M.; Davidson, B.R. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for acute gallstone pancreatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2013**.
  43. Weitz, G.; Woitalla, J.; Wellhoner, P.; Schmidt, K.; Buning, J.; Fellermann, K. Does etiology of acute pancreatitis matter? A review of 391 consecutive episodes. *JOP : Journal of the pancreas* **2015**, *16*, 171-175.
  44. Milheiro, A.; Medeiros, A.; Castro e Sousa, F. [Acute pancreatitis. An analysis of 91 consecutive cases (1988-1991) with a brief review of the literature)]. *Acta medica portuguesa* **1995**, *8*, 269-277.
  45. Silveira, L.V.A.D., A.; Sarabando, G.; Belo Soares, J.P.; Raposo, L.J. Pancreatites Agudas: análise dos factores de prognóstico. *Arquivos Portugueses de Cirurgia* **1996**, *5*, 48-55.
  46. Rosa, I.; Pais, M.J.; Fatima, C.; Queiroz, A. [Acute pancreatitis: update and approach protocol proposal]. *Acta medica portuguesa* **2004**, *17*, 317-324.
  47. Muniraj, T.; Gajendran, M.; Thiruvengadam, S.; Raghuram, K.; Rao, S.; Devaraj, P. Acute pancreatitis. *Disease-a-month : DM* **2012**, *58*, 98-144.
  48. Vipperla, K.; Papachristou, G.I.; Easler, J.; Muddana, V.; Slivka, A.; Whitcomb, D.C.; Yadav, D. Risk of and factors associated with readmission after a sentinel attack of acute pancreatitis.

- Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2014**, *12*, 1911-1919.
49. Trust, M.D.; Sheffield, K.M.; Boyd, C.A.; Benarroch-Gampel, J.; Zhang, D.; Townsend, C.M., Jr.; Riall, T.S. Gallstone pancreatitis in older patients: Are we operating enough? *Surgery* **2011**, *150*, 515-525.
  50. Pandol, S.J.; Saluja, A.K.; Imrie, C.W.; Banks, P.A. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1056. e1051-1056. e1025.
  51. Ren, Y.; Qiu, M.; Zhang, J.; Bi, J.; Wang, M.; Hu, L.; Du, Z.; Li, T.; Zhang, L.; Wang, Y., et al. Low Serum Irisin Concentration Is Associated with Poor Outcomes in Patients with Acute Pancreatitis, and Irisin Administration Protects Against Experimental Acute Pancreatitis. *Antioxidants & redox signaling* **2019**, *31*, 771-785.
  52. Cruz-Santamaria, D.M.; Taxonera, C.; Giner, M. Update on pathogenesis and clinical management of acute pancreatitis. *World journal of gastrointestinal pathophysiology* **2012**, *3*, 60-70.
  53. Wang, G.J.; Gao, C.F.; Wei, D.; Wang, C.; Ding, S.Q. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol* **2009**, *15*, 1427-1430.
  54. Saluja, A.; Dudeja, V.; Dawra, R.; Sah, R.P. Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1979-1993.
  55. Fetaud, V.; Frossard, J.L.; Farina, A.; Pastor, C.M.; Buhler, L.; Dumonceau, J.M.; Hadengue, A.; Hochstrasser, D.F.; Lescuyer, P. Proteomic profiling in an animal model of acute pancreatitis. *Proteomics* **2008**, *8*, 3621-3631.
  56. Criddle, D.N. Reactive oxygen species, Ca(2+) stores and acute pancreatitis; a step closer to therapy? *Cell calcium* **2016**, *60*, 180-189.
  57. Escobar, J.; Pereda, J.; Arduini, A.; Sandoval, J.; Moreno, M.L.; Pérez, S.; Sabater, L.; Aparisi, L.; Cassinello, N.; Hidalgo, J. Oxidative and nitrosative stress in acute pancreatitis. Modulation by pentoxifylline and oxypurinol. *Biochemical pharmacology* **2012**, *83*, 122-130.
  58. Maleth, J.; Balazs, A.; Pallagi, P.; Balla, Z.; Kui, B.; Katona, M.; Judak, L.; Nemeth, I.; Kemeny, L.V.; Rakonczay, Z., Jr., et al. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 427-439. e416.
  59. Venglovecz, V.; Rakonczay, Z., Jr.; Ozsvari, B.; Takacs, T.; Lonovics, J.; Varro, A.; Gray, M.A.; Argent, B.E.; Hegyi, P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut* **2008**, *57*, 1102-1112.
  60. Lee, M.G.; Muallem, S. Pancreatitis: the neglected duct. *Gut* **2008**, *57*, 1037-1039.
  61. Toth, E.; Maleth, J.; Zavogyan, N.; Fanczal, J.; Grassalkovich, A.; Erdos, R.; Pallagi, P.; Horvath, G.; Tretter, L.; Balint, E.R., et al. Novel mitochondrial transition pore inhibitor N-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis. *The Journal of physiology* **2019**, *597*, 5879-5898.
  62. Steer, M. The early intracinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas* **1998**, *17*, 31-37.

63. Liu, L.; Li, Y.; Fan, L.; Zhao, Q.; Wang, D.; Cheng, S.; Zhang, A.; Qin, Y.; Zhang, B. Effect of vascular bradykinin on pancreatic microcirculation and hemorheology in rats with severe acute pancreatitis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* **2015**, *19*, 2646-2650.
64. Kingsnorth, A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* **1997**, *40*, 1-4.
65. Robles, L.; Vaziri, N.D.; Ichii, H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Pancreatitis: Effect of Antioxidant Therapy. *Pancreatic disorders & therapy* **2013**, *3*, 112.
66. Weber, C.K.; Adler, G. From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis. *Pancreatology* **2001**, *1*, 356-362.
67. Cohn, J.A.; Friedman, K.J.; Noone, P.G.; Knowles, M.R.; Silverman, L.M.; Jowell, P.S. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *The New England journal of medicine* **1998**, *339*, 653-658.
68. Mukherjee, R.; Criddle, D.N.; Gukovskaya, A.; Pandol, S.; Petersen, O.H.; Sutton, R. Mitochondrial injury in pancreatitis. *Cell calcium* **2008**, *44*, 14-23.
69. Steer, M.L.; Meldolesi, J.; Figarella, C. Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig Dis Sci* **1984**, *29*, 934-938.
70. Pérez, S.; Pereda, J.; Sabater, L.; Sastre, J. Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox biology* **2015**, *5*, 1-14.
71. Gaiser, S.; Daniluk, J.; Liu, Y.; Tsou, L.; Chu, J.; Lee, W.; Longnecker, D.S.; Logsdon, C.D.; Ji, B. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. *Gut* **2011**, *60*, 1379-1388.
72. Chen, X.; Ji, B.; Han, B.; Ernst, S.A.; Simeone, D.; Logsdon, C.D. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 448-457.
73. Reed, A.M.; Husain, S.Z.; Thrower, E.; Alexandre, M.; Shah, A.; Gorelick, F.S.; Nathanson, M.H. Low extracellular pH induces damage in the pancreatic acinar cell by enhancing calcium signaling. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 1919-1926.
74. Van Acker, G.J.; Saluja, A.K.; Bhagat, L.; Singh, V.P.; Song, A.M.; Steer, M.L. Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **2002**, *283*, G794-800.
75. Silva-Vaz, P.; Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhao, J.G. Multifactorial Scores and Biomarkers of Prognosis of Acute Pancreatitis: Applications to Research and Practice. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
76. Namkung, W.; Han, W.; Luo, X.; Muallem, S.; Cho, K.H.; Kim, K.H.; Lee, M.G. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology* **2004**, *126*, 1844-1859.
77. Pallagi, P.; Venglovecz, V.; Rakonczay, Z., Jr.; Borka, K.; Korompay, A.; Ozsvári, B.; Judak, L.; Sahin-Toth, M.; Geisz, A.; Schnur, A., et al. Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl(-) channels and luminal anion exchangers. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 2228-2239.e2226.
78. OPIE, E.L. THE RELATION OF CHOLELITHIASIS TO DISEASE OF THE PANCREAS. *Journal of the American Medical Association* **1904**, *43*, 1102-1105.

79. Moody, F.G.; Senninger, N.; Runkel, N. Another challenge to the Opie myth. *Gastroenterology* **1993**, *104*, 927-931.
80. Kim, J.Y.; Kim, K.H.; Lee, J.A.; Namkung, W.; Sun, A.Q.; Ananthanarayanan, M.; Suchy, F.J.; Shin, D.M.; Muallem, S.; Lee, M.G. Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca<sup>2+</sup>-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1941-1953.
81. Hegyi, P.; Wilschanski, M.; Muallem, S.; Lukacs, G.L.; Sahin-Toth, M.; Uc, A.; Gray, M.A.; Rakonczay, Z., Jr.; Maleth, J. CFTR: A New Horizon in the Pathomechanism and Treatment of Pancreatitis. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **2016**, *170*, 37-66.
82. Pallagi, P.; Balla, Z.; Singh, A.K.; Dosa, S.; Ivanyi, B.; Kukor, Z.; Toth, A.; Riederer, B.; Liu, Y.; Engelhardt, R., et al. The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice\*. *Crit Care Med* **2014**, *42*, e177-188.
83. Mizuguchi, T.; Mukaiya, M.; Imaizumi, H.; Kimura, Y.; Masuda, Y.; Katsuramaki, T.; Asai, Y.; Hirata, K. Successful management of severe acute pancreatitis with multiple organ failure. *Pancreas* **2004**, *28*, 211-213.
84. Zhang, X.P.; Lin, Q.; Zhou, Y.F. Progress of study on the relationship between mediators of inflammation and apoptosis in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* **2007**, *52*, 1199-1205.
85. Park, B.K.; Chung, J.B.; Lee, J.H.; Suh, J.H.; Park, S.W.; Song, S.Y.; Kim, H.; Kim, K.H.; Kang, J.K. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2003**, *9*, 2266-2269.
86. Sanfey, H.; Bulkley, G.B.; Cameron, J.L. The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg* **1985**, *201*, 633-639.
87. Andican, G.; Gelisgen, R.; Unal, E.; Tortum, O.B.; Dervisoglu, S.; Karahasanoglu, T.; Burcak, G. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2005**, *11*, 2340-2345.
88. Abu-Hilal, M.; McPhail, M.J.; Marchand, L.; Johnson, C.D. Malondialdehyde and superoxide dismutase as potential markers of severity in acute pancreatitis. *JOP : Journal of the pancreas* **2006**, *7*, 185-192.
89. Schoenberg, M.H.; Buchler, M.; Gaspar, M.; Stinner, A.; Younes, M.; Melzner, I.; Bultmann, B.; Beger, H.G. Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut* **1990**, *31*, 1138-1143.
90. Closa, D. Free radicals and acute pancreatitis: much ado about ... something. *Free radical research* **2013**, *47*, 934-940.
91. Booth, D.M.; Mukherjee, R.; Sutton, R.; Criddle, D.N. Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe? *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *15*, 2683-2698.
92. Booth, D.M.; Murphy, J.A.; Mukherjee, R.; Awais, M.; Neoptolemos, J.P.; Gerasimenko, O.V.; Tepikin, A.V.; Petersen, O.H.; Sutton, R.; Criddle, D.N. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 2116-2125.
93. Forkink, M.; Smeitink, J.A.; Brock, R.; Willems, P.H.; Koopman, W.J. Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **2010**, *1797*, 1034-1044.

94. Schulz, H.U.; Niederau, C. Oxidative stress-induced changes in pancreatic acinar cells: insights from in vitro studies. *Hepatology* **1994**, *41*, 309-312.
95. Niederau, C.; Klonowski, H.; Schulz, H.U.; Sarbia, M.; Luthen, R.; Haussinger, D. Oxidative injury to isolated rat pancreatic acinar cells vs. isolated zymogen granules. *Free radical biology & medicine* **1996**, *20*, 877-886.
96. Gossart, S.; Cambon, C.; Orfila, C.; Seguelas, M.H.; Lepert, J.C.; Rami, J.; Carre, P.; Pipy, B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **1996**, *156*, 1540-1548.
97. Isenmann, R.; Henne-Bruns, D.; Adler, G. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Shock and acute pancreatitis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **2003**, *17*, 345-355.
98. Chaari, A.; Abdel Hakim, K.; Bousselmi, K.; Etman, M.; El Bahr, M.; El Saka, A.; Hamza, E.; Ismail, M.; Khalil, E.M.; Kauts, V., et al. Pancreatic injury in patients with septic shock: A literature review. *World journal of gastrointestinal oncology* **2016**, *8*, 526-531.
99. Wang, X.D.; Wang, Q.; Andersson, R.; Ihse, I. Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model. *The British journal of surgery* **1996**, *83*, 1537-1543.
100. Wang, X.D.; Deng, X.M.; Haraldsen, P.; Andersson, R.; Ihse, I. Antioxidant and calcium channel blockers counteract endothelial barrier injury induced by acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* **1995**, *30*, 1129-1136.
101. Volinsky, R.; Kinnunen, P.K. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *The FEBS journal* **2013**, *280*, 2806-2816.
102. Armstrong, J.A.; Cash, N.; Soares, P.M.; Souza, M.H.; Sutton, R.; Criddle, D.N. Oxidative stress in acute pancreatitis: lost in translation? *Free radical research* **2013**, *47*, 917-933.
103. Shalbueva, N.; Mareninova, O.A.; Gerloff, A.; Yuan, J.; Waldron, R.T.; Pandol, S.J.; Gukovskaya, A.S. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 437-446.e436.
104. Schild, L.; Matthias, R.; Stanarius, A.; Wolf, G.; Augustin, W.; Halangk, W. Induction of permeability transition in pancreatic mitochondria by cerulein in rats. *Molecular and cellular biochemistry* **1999**, *195*, 191-197.
105. Lerch, M.M.; Halangk, W.; Mayerle, J. Preventing pancreatitis by protecting the mitochondrial permeability transition pore. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 265-269.
106. Jacob, T.G.; Sreekumar, V.I.; Roy, T.S.; Garg, P.K. Electron-microscopic evidence of mitochondria containing macroautophagy in experimental acute pancreatitis: implications for cell death. *Pancreatology* **2014**, *14*, 454-458.
107. Frossard, J.L.; Rubbia-Brandt, L.; Wallig, M.A.; Benathan, M.; Ott, T.; Morel, P.; Hadengue, A.; Suter, S.; Willecke, K.; Chanson, M. Severe acute pancreatitis and reduced acinar cell apoptosis in the exocrine pancreas of mice deficient for the Cx32 gene. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 481-493.
108. Garg, P.K.; Madan, K.; Pande, G.K.; Khanna, S.; Sathyanarayan, G.; Bohidar, N.P.; Tandon, R.K. Association of extent and infection of pancreatic necrosis with organ failure and death in

- acute necrotizing pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2005**, *3*, 159-166.
109. Mayerle, J.; Schnekenburger, J.; Kruger, B.; Kellermann, J.; Ruthenburger, M.; Weiss, F.U.; Nalli, A.; Domschke, W.; Lerch, M.M. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 1251-1267.
  110. Halangk, W.; Lerch, M.M. A unique pancreatic mitochondrial response to calcium and its role in apoptosis. *Gut* **2009**, *58*, 328-330.
  111. Gukovskaya, A.S.; Pandol, S.J.; Gukovsky, I. New insights into the pathways initiating and driving pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology* **2016**, *32*, 429-435.
  112. Gerasimenko, O.V.; Gerasimenko, J.V. Mitochondrial function and malfunction in the pathophysiology of pancreatitis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **2012**, *464*, 89-99.
  113. Beger, H.G.; Bittner, R.; Block, S.; Buchler, M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology* **1986**, *91*, 433-438.
  114. van Minnen, L.P.; Blom, M.; Timmerman, H.M.; Visser, M.R.; Gooszen, H.G.; Akkermans, L.M. The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **2007**, *11*, 682-689.
  115. McClave, S.A. Drivers of oxidative stress in acute pancreatitis: the role of nutrition therapy. *Journal of parenteral and enteral nutrition* **2012**, *36*, 24-35.
  116. Privette, T.W.; Carlisle, M.C.; Palma, J.K. Emergencies of the liver, gallbladder, and pancreas. *Emergency Medicine Clinics* **2011**, *29*, 293-317.
  117. Carroll, J.K.; Herrick, B.; Gipson, T.; Lee, S.P. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. *American family physician* **2007**, *75*, 1513-1520.
  118. Mitchell, R.M.; Byrne, M.F.; Baillie, J. Pancreatitis. *Lancet (London, England)* **2003**, *361*, 1447-1455.
  119. Smotkin, J.; Tenner, S. Laboratory diagnostic tests in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* **2002**, *34*, 459-462.
  120. Keim, V.; Teich, N.; Fiedler, F.; Hartig, W.; Thiele, G.; Mössner, J. A comparison of lipase and amylase in the diagnosis of acute pancreatitis in patients with abdominal pain. *Pancreas* **1998**, *16*, 45-49.
  121. Treacy, J.; Williams, A.; Bais, R.; Willson, K.; Worthley, C.; Reece, J.; Bessell, J.; Thomas, D. Evaluation of amylase and lipase in the diagnosis of acute pancreatitis. *ANZ journal of surgery* **2001**, *71*, 577-582.
  122. Bree, R.L.; Ralls, P.W.; Balfe, D.M.; DiSantis, D.J.; Glick, S.N.; Levine, M.S.; Megibow, A.J.; Saini, S.; Shuman, W.P.; Greene, F.L., et al. Evaluation of patients with acute right upper quadrant pain. American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria. *Radiology* **2000**, *215 Suppl*, 153-157.
  123. Cucher, D.; Kulvatunyou, N.; Green, D.J.; Jie, T.; Ong, E.S. Gallstone pancreatitis: a review. *The Surgical clinics of North America* **2014**, *94*, 257-280.

124. Turkvatan, A.; Erden, A.; Turkoglu, M.A.; Secil, M.; Yener, O. Imaging of acute pancreatitis and its complications. Part 1: acute pancreatitis. *Diagnostic and interventional imaging* **2015**, *96*, 151-160.
125. Repiso, A.; Gomez-Rodriguez, R.; Garcia-Vela, A.; Perez-Grueso, M.J.; Martin, R.; Romero, M.; Carrobles, J.M. [Endosonographic examination of the common bile duct in patients with acute biliary pancreatitis]. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* **2008**, *100*, 337-342.
126. Verma, D.; Kapadia, A.; Eisen, G.M.; Adler, D.G. EUS vs MRCP for detection of choledocholithiasis. *Gastrointestinal endoscopy* **2006**, *64*, 248-254.
127. Balthazar, E.J. Acute pancreatitis: assessment of severity with clinical and CT evaluation. *Radiology* **2002**, *223*, 603-613.
128. Ke, L.; Mao, W.; Li, X.; Zhou, J.; Li, G.; Ye, B.; Tong, Z.; Li, W. The Pancreatitis Activity Scoring System in Predicting Infection of Pancreatic Necrosis. *Am J Gastroenterol* **2018**, *113*, 1393-1394.
129. Porter, K.K.; Zaheer, A.; Kamel, I.R.; Horowitz, J.M.; Arif-Tiwari, H.; Bartel, T.B.; Bashir, M.R.; Camacho, M.A.; Cash, B.D.; Chernyak, V., et al. ACR Appropriateness Criteria(R) Acute Pancreatitis. *Journal of the American College of Radiology : JACR* **2019**, *16*, S316-S330.
130. Zhang, X.-X.; Deng, L.-H.; Chen, W.-W.; Shi, N.; Jin, T.; Lin, Z.-Q.; Ma, Y.; Jiang, K.; Yang, X.-N.; Xia, Q. Circulating microRNA 216 as a marker for the early identification of severe acute pancreatitis. *The American journal of the medical sciences* **2017**, *353*, 178-186.
131. Wilson, C.; Heath, D.I.; Imrie, C.W. Prediction of outcome in acute pancreatitis: a comparative study of APACHE II, clinical assessment and multiple factor scoring systems. *The British journal of surgery* **1990**, *77*, 1260-1264.
132. McMahon, M.J.; Playforth, M.J.; Pickford, I.R. A comparative study of methods for the prediction of severity of attacks of acute pancreatitis. *The British journal of surgery* **1980**, *67*, 22-25.
133. Ranson, J.H. The timing of biliary surgery in acute pancreatitis. *Ann Surg* **1979**, *189*, 654-663.
134. Imrie, C.W.; Benjamin, I.S.; Ferguson, J.C.; McKay, A.J.; Mackenzie, I.; O'Neill, J.; Blumgart, L.H. A single-centre double-blind trial of Trasylol therapy in primary acute pancreatitis. *The British journal of surgery* **1978**, *65*, 337-341.
135. Buxbaum, J.; Quezada, M.; Chong, B.; Gupta, N.; Yu, C.Y.; Lane, C.; Da, B.; Leung, K.; Shulman, I.; Pandol, S., et al. The Pancreatitis Activity Scoring System predicts clinical outcomes in acute pancreatitis: findings from a prospective cohort study. *Am J Gastroenterol* **2018**, *113*, 755-764.
136. Knaus, W.A.; Draper, E.A.; Wagner, D.P.; Zimmerman, J.E. APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine* **1985**, *13*, 818-829.
137. Wu, B.U.; Johannes, R.S.; Sun, X.; Tabak, Y.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: a large population-based study. *Gut* **2008**, *57*, 1698-1703.
138. Zheng, L.; Hong, W.; Geng, W.; Stock, S.; Pan, J. A comparison of the BISAP score and Amylase and BMI (CAB) score versus for predicting severe acute pancreatitis. *Acta gastroenterologica Belgica* **2019**, *82*, 397-400.

139. Arif, A.; Jaleel, F.; Rashid, K. Accuracy of BISAP score in prediction of severe acute pancreatitis. *Pakistan journal of medical sciences* **2019**, *35*, 1008-1012.
140. Park, J.Y.; Jeon, T.J.; Ha, T.H.; Hwang, J.T.; Sinn, D.H.; Oh, T.H.; Shin, W.C.; Choi, W.C. Bedside index for severity in acute pancreatitis: comparison with other scoring systems in predicting severity and organ failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2013**, *12*, 645-650.
141. Wu, B.U.; Bakker, O.J.; Papachristou, G.I.; Besselink, M.G.; Repas, K.; van Santvoort, H.C.; Muddana, V.; Singh, V.K.; Whitcomb, D.C.; Gooszen, H.G. Blood urea nitrogen in the early assessment of acute pancreatitis: an international validation study. *Archives of internal medicine* **2011**, *171*, 669-676.
142. Mounzer, R.; Langmead, C.J.; Wu, B.U.; Evans, A.C.; Bishehsari, F.; Muddana, V.; Singh, V.K.; Slivka, A.; Whitcomb, D.C.; Yadav, D., et al. Comparison of existing clinical scoring systems to predict persistent organ failure in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1476-1482; quiz e1415-1476.
143. Mofidi, R.; Duff, M.; Wigmore, S.; Madhavan, K.; Garden, O.; Parks, R. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *British Journal of Surgery: Incorporating European Journal of Surgery and Swiss Surgery* **2006**, *93*, 738-744.
144. Singh, V.K.; Wu, B.U.; Bollen, T.L.; Repas, K.; Maurer, R.; Johannes, R.S.; Morteale, K.J.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. A prospective evaluation of the bedside index for severity in acute pancreatitis score in assessing mortality and intermediate markers of severity in acute pancreatitis. *The American journal of gastroenterology* **2009**, *104*, 966.
145. Li, M.; Xing, X.K.; Lu, Z.H.; Guo, F.; Su, W.; Lin, Y.J.; Wang, D.H. Comparison of Scoring Systems in Predicting Severity and Prognosis of Hypertriglyceridemia-Induced Acute Pancreatitis. *Dig Dis Sci* **2019**, 10.1007/s10620-019-05827-9.
146. Khanna, A.K.; Meher, S.; Prakash, S.; Tiwary, S.K.; Singh, U.; Srivastava, A.; Dixit, V. Comparison of Ranson, Glasgow, MOSS, SIRS, BISAP, APACHE-II, CTSI Scores, IL-6, CRP, and procalcitonin in predicting severity, organ failure, pancreatic necrosis, and mortality in acute pancreatitis. *Hpb Surgery* **2013**, *2013*.
147. Miko, A.; Vigh, E.; Matrai, P.; Soos, A.; Garami, A.; Balasko, M.; Czako, L.; Mosdosi, B.; Sarlos, P.; Eross, B., et al. Computed Tomography Severity Index vs. Other Indices in the Prediction of Severity and Mortality in Acute Pancreatitis: A Predictive Accuracy Meta-analysis. *Front Physiol* **2019**, *10*, 1002.
148. Kiat, T.T.J.; Gunasekaran, S.K.; Junnarkar, S.P.; Low, J.K.; Woon, W.; Shelat, V.G. Are traditional scoring systems for severity stratification of acute pancreatitis sufficient? *Annals of hepato-biliary-pancreatic surgery* **2018**, *22*, 105-115.
149. Papachristou, G.I.; Papachristou, D.J.; Avula, H.; Slivka, A.; Whitcomb, D.C. Obesity increases the severity of acute pancreatitis: performance of APACHE-O score and correlation with the inflammatory response. *Pancreatology* **2006**, *6*, 279-285.
150. Harshit Kumar, A.; Singh Griwan, M. A comparison of APACHE II, BISAP, Ranson's score and modified CTSI in predicting the severity of acute pancreatitis based on the 2012 revised Atlanta Classification. *Gastroenterology report* **2018**, *6*, 127-131.



151. Sahu, B.; Abbey, P.; Anand, R.; Kumar, A.; Tomer, S.; Malik, E. Severity assessment of acute pancreatitis using CT severity index and modified CT severity index: Correlation with clinical outcomes and severity grading as per the Revised Atlanta Classification. *The Indian journal of radiology & imaging* **2017**, *27*, 152-160.
152. Yadav, A.K.; Sharma, R.; Kandasamy, D.; Bhalla, A.S.; Gamanagatti, S.; Srivastava, D.N.; Upadhyay, A.D.; Garg, P.K. Perfusion CT: can it predict the development of pancreatic necrosis in early stage of severe acute pancreatitis? *Abdominal imaging* **2015**, *40*, 488-499.
153. Balthazar, E.J.; Ranson, J.H.; Naidich, D.P.; Megibow, A.J.; Caccavale, R.; Cooper, M.M. Acute pancreatitis: prognostic value of CT. *Radiology* **1985**, *156*, 767-772.
154. Balthazar, E.J.; Robinson, D.L.; Megibow, A.J.; Ranson, J.H. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* **1990**, *174*, 331-336.
155. Mortelet, K.J.; Mergo, P.J.; Taylor, H.M.; Wiesner, W.; Cantisani, V.; Ernst, M.D.; Kalantari, B.N.; Ros, P.R. Peripancreatic vascular abnormalities complicating acute pancreatitis: contrast-enhanced helical CT findings. *European journal of radiology* **2004**, *52*, 67-72.
156. Li, X.; Guo, X.; Ji, H.; Niu, J.; Gao, P. Relationships between Metabolic Comorbidities and Occurrence, Severity, and Outcomes in Patients with Acute Pancreatitis: A Narrative Review. *Biomed Res Int* **2019**, *2019*, 2645926.
157. Mikolasevic, I.; Milic, S.; Orlic, L.; Poropat, G.; Jakopcic, I.; Franjic, N.; Klanac, A.; Kristo, N.; Stimac, D. Metabolic syndrome and acute pancreatitis. *European journal of internal medicine* **2016**, *32*, 79-83.
158. Deng, L.H.; Xue, P.; Xia, Q.; Yang, X.N.; Wan, M.H. Effect of admission hypertriglyceridemia on the episodes of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2008**, *14*, 4558-4561.
159. Szentesi, A.; Parniczky, A.; Vincze, A.; Bajor, J.; Godi, S.; Sarlos, P.; Gede, N.; Izbeki, F.; Halasz, A.; Marta, K., et al. Multiple Hits in Acute Pancreatitis: Components of Metabolic Syndrome Synergize Each Other's Deteriorating Effects. *Front Physiol* **2019**, *10*, 1202.
160. Lankisch, P.G.; Schirren, C.A. Increased body weight as a prognostic parameter for complications in the course of acute pancreatitis. *Pancreas* **1990**, *5*, 626-629.
161. Krishna, S.G.; Hinton, A.; Oza, V.; Hart, P.A.; Swei, E.; El-Dika, S.; Stanich, P.P.; Hussan, H.; Zhang, C.; Conwell, D.L. Morbid Obesity Is Associated With Adverse Clinical Outcomes in Acute Pancreatitis: A Propensity-Matched Study. *Am J Gastroenterol* **2015**, *110*, 1608-1619.
162. Sawalhi, S.; Al-Maramhy, H.; Abdelrahman, A.I.; Allah, S.E.; Al-Jubori, S. Does the presence of obesity and/or metabolic syndrome affect the course of acute pancreatitis?: A prospective study. *Pancreas* **2014**, *43*, 565-570.
163. Valdivielso, P.; Ramirez-Bueno, A.; Ewald, N. Current knowledge of hypertriglyceridemic pancreatitis. *European journal of internal medicine* **2014**, *25*, 689-694.
164. Dominguez-Munoz, J.E.; Junemann, F.; Malferteiner, P. Hyperlipidemia in acute pancreatitis. Cause or epiphenomenon? *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **1995**, *18*, 101-106.
165. Zeng, Y.; Zhang, W.; Lu, Y.; Huang, C.; Wang, X. Impact of hypertriglyceridemia on the outcome of acute biliary pancreatitis. *Am J Med Sci* **2014**, *348*, 399-402.

166. Kylanpaa, M.L.; Repo, H.; Puolakkainen, P.A. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2010**, *16*, 2867-2872.
167. F, D.O.M.; Gomes, B.C.; Rodrigues, A.S.; Rueff, J. Genetic Susceptibility in Acute Pancreatitis: Genotyping of GSTM1, GSTT1, GSTP1, CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, LTA, TNFRSF1B, and TP53 Gene Variants. *Pancreas* **2017**, *46*, 71-76.
168. Rau, B.M.; Kruger, C.M.; Schilling, M.K. Anti-cytokine strategies in acute pancreatitis: pathophysiological insights and clinical implications. *Roczniki Akademii Medycznej w Bialymstoku (1995)* **2005**, *50*, 106-115.
169. Pastor, C.M.; Morel, D.R.; Vonlaufen, A.; Schiffer, E.; Lescuyer, P.; Frossard, J.L. Delayed production of IL-18 in lungs and pancreas of rats with acute pancreatitis. *Pancreatology* **2010**, *10*, 752-757.
170. Soyalp, M.; Yalcin, M.; Oter, V.; Ozgonul, A. Investigation of procalcitonin, IL-6, oxidative stress index (OSI) plasma and tissue levels in experimental mild and severe pancreatitis in rats. *Bratislavske lekarske listy* **2017**, *118*, 137-141.
171. Jiang, C.F.; Shiao, Y.C.; Ng, K.W.; Tan, S.W. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* **2004**, *67*, 442-446.
172. Li, Y.; Bai, J.; He, B.; Wang, N.; Wang, H.; Liu, D. Weak association between the interleukin-8 rs4073 polymorphism and acute pancreatitis: a cumulative meta-analysis. *BMC medical genetics* **2019**, *20*, 129.
173. Gross, V.; Andreesen, R.; Leser, H.G.; Ceska, M.; Liehl, E.; Lausen, M.; Farthmann, E.H.; Scholmerich, J. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *European journal of clinical investigation* **1992**, *22*, 200-203.
174. Rau, B.; Steinbach, G.; Gansauge, F.; Mayer, J.M.; Grunert, A.; Beger, H.G. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* **1997**, *41*, 832-840.
175. Dugernier, T.L.; Laterre, P.F.; Wittebole, X.; Roeseler, J.; Latinne, D.; Reynaert, M.S.; Pugin, J. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2003**, *168*, 148-157.
176. Wilson, C.; Heads, A.; Shenkin, A.; Imrie, C. C-reactive protein, antiproteases and complement factors as objective markers of severity in acute pancreatitis. *British Journal of Surgery* **1989**, *76*, 177-181.
177. Lelubre, C.; Anselin, S.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Biston, P.; Piagnerelli, M. Interpretation of C-reactive protein concentrations in critically ill patients. *BioMed research international* **2013**, *2013*.
178. Mayer, A.; McMahon, M.; Bowen, M.; Cooper, E. C reactive protein: an aid to assessment and monitoring of acute pancreatitis. *Journal of clinical pathology* **1984**, *37*, 207-211.
179. Lavin, M. Assessment of clinical severity and prognosis. *The pancreas* **1998**, 489-502.
180. Büchler, M.; Malferteiner, P.; Schoetensack, C.; Uhl, W.; Beger, H.G. Sensitivity of antiproteases, complement factors and C-reactive protein in detecting pancreatic necrosis.

- Results of a prospective clinical study. *International Journal of pancreatology* **1986**, *1*, 227-235.
181. Leese, T.; Shaw, D.; Holliday, M. Prognostic markers in acute pancreatitis: can pancreatic necrosis be predicted? *Annals of the Royal College of Surgeons of England* **1988**, *70*, 227.
  182. Pieri, G.; Agarwal, B.; Burroughs, A.K. C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis. *Annals of Gastroenterology: Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology* **2014**, *27*, 113.
  183. Parniczky, A.; Lantos, T.; Toth, E.M.; Szakacs, Z.; Godi, S.; Hagendorn, R.; Illes, D.; Koncz, B.; Marta, K.; Miko, A., et al. Antibiotic therapy in acute pancreatitis: From global overuse to evidence based recommendations. *Pancreatology* **2019**, *19*, 488-499.
  184. Al-Nawas, B.; Krammer, I.; Shah, P.M. Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *European journal of medical research* **1996**, *1*, 331-333.
  185. Woo, S.M.; Noh, M.H.; Kim, B.G.; Hsing, C.T.; Han, J.S.; Ryu, S.H.; Seo, J.M.; Yoon, H.A.; Jang, J.S.; Choi, S.R., et al. Comparison of serum procalcitonin with Ranson, APACHE-II, Glasgow and Balthazar CT severity index scores in predicting severity of acute pancreatitis. *The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi* **2011**, *58*, 31-37.
  186. Mofidi, R.; Suttie, S.A.; Patil, P.V.; Ogston, S.; Parks, R.W. The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: systematic review. *Surgery* **2009**, *146*, 72-81.
  187. Harrison, D.A.; D'Amico, G.; Singer, M. The Pancreatitis Outcome Prediction (POP) Score: a new prognostic index for patients with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* **2007**, *35*, 1703-1708.
  188. Wu, B.U.; Johannes, R.S.; Sun, X.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. Early changes in blood urea nitrogen predict mortality in acute pancreatitis. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 129-135.
  189. Babitt, J.L.; Huang, F.W.; Wrighting, D.M.; Xia, Y.; Sidis, Y.; Samad, T.A.; Campagna, J.A.; Chung, R.T.; Schneyer, A.L.; Woolf, C.J. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics* **2006**, *38*, 531.
  190. Kulaksiz, H.; Fein, E.; Redecker, P.; Stremmel, W.; Adler, G.; Cetin, Y. Pancreatic b-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *Journal of Endocrinology* **2008**, *197*, 241-250.
  191. Arabul, M.; Celik, M.; Aslan, O.; Torun, S.; Beyazit, Y.; Alper, E.; Kandemir, A.; Unsal, B. Hepcidin as a predictor of disease severity in acute pancreatitis: a single center prospective study. *Hepatogastroenterology* **2013**, *60*, 595-600.
  192. Franco-Pons, N.; Casas, J.; Fabrias, G.; Gea-Sorli, S.; de-Madaria, E.; Gelpi, E.; Closa, D. Fat necrosis generates proinflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis. *Ann Surg* **2013**, *257*, 943-951.
  193. de-Madaria, E.; Molero, X.; Bonjoch, L.; Casas, J.; Cardenas-Jaen, K.; Montenegro, A.; Closa, D. Oleic acid chlorohydrin, a new early biomarker for the prediction of acute pancreatitis severity in humans. *Ann Intensive Care* **2018**, *8*, 1.
  194. Suppiah, A.; Malde, D.; Arab, T.; Hamed, M.; Allgar, V.; Smith, A.M.; Morris-Stiff, G. The prognostic value of the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in acute pancreatitis: identification

- of an optimal NLR. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **2013**, *17*, 675-681.
195. Binnetoglu, E.; Akbal, E.; Gunes, F.; Sen, H. The prognostic value of neutrophil-lymphocyte ratio in acute pancreatitis is controversial. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **2014**, *18*, 885.
196. Cardoso, F.S.; Ricardo, L.B.; Oliveira, A.M.; Canena, J.M.; Horta, D.V.; Papoila, A.L.; Deus, J.R. C-reactive protein prognostic accuracy in acute pancreatitis: timing of measurement and cutoff points. *European journal of gastroenterology & hepatology* **2013**, *25*, 784-789.
197. Purkayastha, S.; Chow, A.; Athanasiou, T.; Cambaroudis, A.; Panesar, S.; Kinross, J.; Tekkis, P.; Darzi, A. Does serum procalcitonin have a role in evaluating the severity of acute pancreatitis? A question revisited. *World journal of surgery* **2006**, *30*, 1713-1721.
198. Kaplan, M.; Ates, I.; Oztas, E.; Yuksel, M.; Akpınar, M.Y.; Coskun, O.; Kayacetin, E. A New Marker to Determine Prognosis of Acute Pancreatitis: PLR and NLR Combination. *Journal of medical biochemistry* **2018**, *37*, 21-30.
199. Zhou, H.; Mei, X.; He, X.; Lan, T.; Guo, S. Severity stratification and prognostic prediction of patients with acute pancreatitis at early phase: A retrospective study. *Medicine* **2019**, *98*, e15275.
200. Petricoin, E.F.; Zoon, K.C.; Kohn, E.C.; Barrett, J.C.; Liotta, L.A. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nature reviews. Drug discovery* **2002**, *1*, 683-695.
201. Papachristou, G.I.; Malehorn, D.E.; Lamb, J.; Slivka, A.; Bigbee, W.L.; Whitcomb, D.C. Serum proteomic patterns as a predictor of severity in acute pancreatitis. *Pancreatology* **2007**, *7*, 317-324.
202. Sandstrom, A.; Andersson, R.; Segersvard, R.; Lohr, M.; Borrebaeck, C.A.; Wingren, C. Serum proteome profiling of pancreatitis using recombinant antibody microarrays reveals disease-associated biomarker signatures. *Proteomics. Clinical applications* **2012**, *6*, 486-496.
203. Garcia-Hernandez, V.; Sanchez-Bernal, C.; Sarmiento, N.; Viana, R.A.; Ferreira, L.; Perez, N.; Calvo, J.J.; Sanchez-Yague, J. Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal+mitochondrial fractions from rat pancreas: Implications for cerulein-induced acute pancreatitis. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1824*, 1058-1067.
204. Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **1999**, *29*, 1181-1189.
205. Jarak, I.; Pereira, S.S.; Carvalho, R.A.; Oliveira, P.F.; Alves, M.G.; Guimarães, M.; Wewer Albrechtsen, N.J.; Holst, J.J.; Nora, M.; Monteiro, M.P. Gastric Bypass with Different Biliopancreatic Limb Lengths Results in Similar Post-absorptive Metabolomics Profiles. *Obesity surgery* **2020**, *30*, 1068-1078.
206. Ma, C.; Tian, B.; Wang, J.; Yang, G.-J.; Pan, C.-S.; Lu, J.-P. Metabolic characteristics of acute necrotizing pancreatitis and chronic pancreatitis. *Molecular medicine reports* **2012**, *6*, 57-62.

207. Gu, W.; Tong, Z. Clinical Application of Metabolomics in Pancreatic Diseases: A Mini-Review. *Laboratory medicine* **2020**, *51*, 116-121.
208. Villasenor, A.; Kinross, J.M.; Li, J.V.; Penney, N.; Barton, R.H.; Nicholson, J.K.; Darzi, A.; Barbas, C.; Holmes, E. <sup>1</sup>H NMR global metabolic phenotyping of acute pancreatitis in the emergency unit. *Journal of proteome research* **2014**, *13*, 5362-5375.
209. Luszczek, E.R.; Paulo, J.A.; Saltzman, J.R.; Kadiyala, V.; Banks, P.A.; Beilman, G.; Conwell, D.L. Urinary <sup>1</sup>H-NMR metabolomics can distinguish pancreatitis patients from healthy controls. *JOP : Journal of the pancreas* **2013**, *14*, 161-170.
210. Xu, H.; Zhang, L.; Kang, H.; Zhang, J.; Liu, J.; Liu, S. Serum Metabonomics of Mild Acute Pancreatitis. *Journal of clinical laboratory analysis* **2016**, *30*, 990-998.
211. Xiao, H.; Huang, J.-h.; Zhang, X.-w.; Ahmed, R.; Xie, Q.-l.; Li, B.; Zhu, Y.-m.; Cai, X.; Peng, Q.-h.; Qin, Y.-h. Identification of potential diagnostic biomarkers of acute pancreatitis by serum metabolomic profiles. *Pancreatology* **2017**, *17*, 543-549.
212. Huang, J.H.; He, D.; Chen, L.; Dong, C.Y.; Zhang, S.H.; Qin, Y.H.; Yu, R.; Ahmed, R.; Kuang, J.J.; Zhang, X.W. GC-MS based metabolomics strategy to distinguish three types of acute pancreatitis. *Pancreatology* **2019**, *19*, 630-637.
213. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* **1990**, *186*, 464-478.
214. Oguntibeju, O.O.; Meyer, S.; Aboua, Y.G.; Goboza, M. Hypoxia hemerocallidea Significantly Reduced Hyperglycaemia and Hyperglycaemic-Induced Oxidative Stress in the Liver and Kidney Tissues of Streptozotocin-Induced Diabetic Male Wistar Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2016**, *2016*, 8934362.
215. Song, X.; Hu, W.; Yu, H.; Wang, H.; Zhao, Y.; Korngold, R.; Zhao, Y. Existence of Circulating Mitochondria in Human and Animal Peripheral Blood. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
216. Geng, X.; Zhang, Y.; Yan, J.; Chu, C.; Gao, F.; Jiang, Z.; Zhang, X.; Chen, Y.; Wei, X.; Feng, Y., et al. Mitochondrial DNA mutation m.3243A>G is associated with altered mitochondrial function in peripheral blood mononuclear cells, with heteroplasmy levels and with clinical phenotypes. *Diabet Med* **2019**, *36*, 776-783.
217. Chakraborty, M.; Hickey, A.J.; Petrov, M.S.; Macdonald, J.R.; Thompson, N.; Newby, L.; Sim, D.; Windsor, J.A.; Phillips, A.R. Mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells in early experimental and clinical acute pancreatitis. *Pancreatology* **2016**, *16*, 739-747.
218. Cossarizza, A.; Baccarani-Contri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, *197*, 40-45.
219. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Marcu, A.; Guo, A.C.; Liang, K.; Vazquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N., et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research* **2018**, *46*, D608-d617.
220. Jarak, I.; Carrola, J.; Barros, A.S.; Gil, A.M.; Pereira, M.L.; Corvo, M.L.; Duarte, I.F. From the Cover: Metabolism Modulation in Different Organs by Silver Nanoparticles: An NMR

- Metabolomics Study of a Mouse Model. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2017**, *159*, 422-435.
221. Savorani, F.; Tomasi, G.; Engelsen, S.B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2010**, *202*, 190-202.
222. Dieterle, F.; Ross, A.; Schlotterbeck, G.; Senn, H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Analytical chemistry* **2006**, *78*, 4281-4290.
223. Triba, M.N.; Le Moyec, L.; Amathieu, R.; Goossens, C.; Bouchemal, N.; Nahon, P.; Rutledge, D.N.; Savarin, P. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular bioSystems* **2015**, *11*, 13-19.
224. Singh, V.K.; Wu, B.U.; Bollen, T.L.; Repas, K.; Maurer, R.; Mortelet, K.J.; Banks, P.A. Early systemic inflammatory response syndrome is associated with severe acute pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2009**, *7*, 1247-1251.
225. Churg, A.; Richter, W. Early changes in the exocrine pancreas of the dog and rat after ligation of the pancreatic duct. A light and electron microscopic study. *The American journal of pathology* **1971**, *63*, 521.
226. Seidel, H. Bemerkungen zu meiner Methode der experimentellen Erzeugung der akuten hämorrhagischen Pankreatitis. *Zentralbl Chir* **1910**, *37*, 1601-1604.
227. Le, T.; Eisses, J.F.; Lemon, K.L.; Ozolek, J.A.; Pociask, D.A.; Orabi, A.I.; Husain, S.Z. Intra-ductal infusion of taurocholate followed by distal common bile duct ligation leads to a severe, necrotic model of pancreatitis in mice. *Pancreas* **2015**, *44*, 493.
228. Lampel, M.; Kern, H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Archiv A* **1977**, *373*, 97-117.
229. Dąbrowski, A.; Konturek, S.J.; Konturek, J.W.; Gabryelewicz, A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *European journal of pharmacology* **1999**, *377*, 1-11.
230. Li, H.C.; Fan, X.J.; Chen, Y.F.; Tu, J.M.; Pan, L.Y.; Chen, T.; Yin, P.H.; Peng, W.; Feng, D.X. Early prediction of intestinal mucosal barrier function impairment by elevated serum procalcitonin in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreatology* **2016**, *16*, 211-217.
231. Wang, X.; Zeng, X.; Yang, B.; Zhao, S.; Chen, W.; Guo, X. Efficacy of thymosin alpha1 and interferon alpha for the treatment of severe acute pancreatitis in a rat model. *Mol Med Rep* **2015**, *12*, 6775-6781.
232. Klopfleisch, R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology-a systematic review. *BMC veterinary research* **2013**, *9*, 123.
233. Zhang, J.; Rouse, R.L. Histopathology and pathogenesis of caerulein-, duct ligation-, and arginine-induced acute pancreatitis in Sprague-Dawley rats and C57BL6 mice. *Histology and histopathology* **2014**, *29*, 1135-1152.
234. Lévy, P.; Lettéron, P.; Paye, F.; Molas, G.; Guimont, M.C.; Pessayre, D.; Bernades, P.; Rozé, C. In vivo assessment of lipid peroxidation in experimental edematous and necrotizing rat pancreatitis. *Pancreas* **1997**, *14*, 350-354.

235. Takács, T.; Czakó, L.; Morschl, E.; László, F.; Tiszlavicz, L.; Rakonczay, Z., Jr.; Lonovics, J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* **2002**, *25*, 277-282.
236. Krajewski, E.; Krajewski, J.; Spodnik, J.H.; Figarski, A.; Kubasik-Juraniec, J. Changes in the morphology of the acinar cells of the rat pancreas in the oedematous and necrotic types of experimental acute pancreatitis. *Folia morphologica* **2005**, *64*, 292-303.
237. Kandemir, A.; Coşkun, A.; Yavaşoğlu, İ.; Bolaman, Z.; Ünübol, M.; Yaşa, M.H.; Kadıköylü, G. Therapeutic plasma exchange for hypertriglyceridemia induced acute pancreatitis: the 33 cases experience from a tertiary reference center in Turkey. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* **2018**, *29*, 676-683.
238. Fanczal, J.; Pallagi, P.; Görög, M.; Diszházi, G.; Almássy, J.; Madácsy, T.; Varga, Á.; Csernay-Biró, P.; Katona, X.; Tóth, E., et al. TRPM2-mediated extracellular Ca(2+) entry promotes acinar cell necrosis in biliary acute pancreatitis. *The Journal of physiology* **2020**, *598*, 1253-1270.
239. Frossard, J.L.; Lescuyer, P.; Pastor, C.M. Experimental evidence of obesity as a risk factor for severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2009**, *15*, 5260-5265.
240. Lopez-Font, I.; Gea-Sorlí, S.; de-Madaria, E.; Gutiérrez, L.M.; Pérez-Mateo, M.; Closa, D. Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2010**, *16*, 3411-3417.
241. Yönetçi, N.; Oruç, N.; Özütemiz, A.Ö.; Çelik, H.A.; Yüce, G. Effects of mast-cell stabilization in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *International Journal of Pancreatology* **2001**, *29*, 163-171.
242. Yasuno, K.; Igura, S.; Yamaguchi, Y.; Imaoka, M.; Kai, K.; Mori, K. Pathological examination of spontaneous vacuolation of pancreatic acinar cells in mice. *Journal of toxicologic pathology* **2019**, *32*, 105-109.
243. Helin, H.; Mero, M.; Markkula, H.; Helin, M. Pancreatic acinar ultrastructure in human acute pancreatitis. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology* **1980**, *387*, 259-270.
244. Hashimoto, D.; Ohmuraya, M.; Hirota, M.; Yamamoto, A.; Suyama, K.; Ida, S.; Okumura, Y.; Takahashi, E.; Kido, H.; Araki, K., et al. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *The Journal of cell biology* **2008**, *181*, 1065-1072.
245. Ohshio, G.; Saluja, A.; Steer, M. Effects of short-term pancreatic duct obstruction in rats. *Gastroenterology* **1991**, *100*, 196-202.
246. Dickson, A.; Foulis, A.; Imrie, C. Histology and bacteriology of closed duodenal loop models of experimental acute pancreatitis in the rat. *Digestion* **1986**, *34*, 15-21.
247. Jaworek, J.; Konturek, S.J.; Macko, M.; Kot, M.; Szklarczyk, J.; Leja-Szpak, A.; Nawrot-Porabka, K.; Stachura, J.; Tomaszewska, R.; Siwicki, A., et al. Endotoxemia in newborn rats attenuates acute pancreatitis at adult age. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **2007**, *58*, 131-147.

248. Que, R.S.; Cao, L.P.; Ding, G.P.; Hu, J.A.; Mao, K.J.; Wang, G.F. Correlation of nitric oxide and other free radicals with the severity of acute pancreatitis and complicated systemic inflammatory response syndrome. *Pancreas* **2010**, *39*, 536-540.
249. Song, J.Y.; Lim, J.W.; Kim, H.; Morio, T.; Kim, K.H. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 36676-36687.
250. Milnerowicz, H.; Bukowski, R.; Jabłonowska, M.; Ściskalska, M.; Milnerowicz, U. The antioxidant profiles, lysosomal and membrane enzymes activity in patients with acute pancreatitis. *Mediators Inflamm* **2014**, *2014*, 376518.
251. Sanfey, H.; Bulkley, G.B.; Cameron, J.L. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* **1984**, *200*, 405-413.
252. Liu, X.; Zhu, Q.; Zhang, M.; Yin, T.; Xu, R.; Xiao, W.; Wu, J.; Deng, B.; Gao, X.; Gong, W., et al. Isoliquiritigenin Ameliorates Acute Pancreatitis in Mice via Inhibition of Oxidative Stress and Modulation of the Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, 7161592.
253. Zhang, X.; Xin, G.; Li, S.; Wei, Z.; Ming, Y.; Yuan, J.; Wen, E.; Xing, Z.; Yu, K.; Li, Y., et al. Dehydrocholic Acid Ameliorates Sodium Taurocholate-Induced Acute Biliary Pancreatitis in Mice. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2020**, *43*, 985-993.
254. Bruce, J.I.E. TRPM2 and biliary acute pancreatitis. *The Journal of physiology* **2020**, *598*, 1119-1120.
255. Gukovskaya, A.S.; Gukovsky, I. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1876-1880.
256. Perez, S.; Pereda, J.; Sabater, L.; Sastre, J. Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox biology* **2015**, *5*, 1-14.
257. Takeda, K.; Mikami, Y.; Fukuyama, S.; Egawa, S.; Sunamura, M.; Ishibashi, T.; Sato, A.; Masamune, A.; Matsuno, S. Pancreatic ischemia associated with vasospasm in the early phase of human acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* **2005**, *30*, 40-49.
258. Kusterer, K.; Poschmann, T.; Friedemann, A.; Enghofer, M.; Zender, S.; Usadel, K.H. Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *The American journal of physiology* **1993**, *265*, G165-171.
259. Shi, C.; Andersson, R.; Zhao, X.; Wang, X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* **2005**, *5*, 492-500.
260. Kikuta, K.; Masamune, A.; Satoh, M.; Suzuki, N.; Shimosegawa, T. 4-hydroxy-2, 3-nonenal activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World journal of gastroenterology* **2004**, *10*, 2344-2351.
261. Bopanna, S.; Nayak, B.; Prakash, S.; Shalimar; Mahapatra, S.J.; Garg, P.K. Increased oxidative stress and deficient antioxidant levels may be involved in the pathogenesis of idiopathic recurrent acute pancreatitis. *Pancreatology* **2017**, *17*, 529-533.
262. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, *2014*, 360438.



263. Sultana, R.; Butterfield, D.A. Slot-blot analysis of 3-nitrotyrosine-modified brain proteins. *Methods in enzymology* **2008**, *440*, 309-316.
264. Marrocco, I.; Altieri, F.; Peluso, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 6501046.
265. Abreu, F.F.; Souza, A.C.A.; Teixeira, S.A.; Soares, A.G.; Teixeira, D.F.; Soares, R.C.; Santana, M.T.; Lauton Santos, S.; Costa, S.K.P.; Muscará, M.N., et al. Elucidating the role of oxidative stress in the therapeutic effect of rutin on experimental acute pancreatitis. *Free radical research* **2016**, *50*, 1350-1360.
266. Colombo, G.; Clerici, M.; Garavaglia, M.E.; Giustarini, D.; Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2016**, *1019*, 178-190.
267. Meister, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, 9397-9400.
268. Kruse, P.; Anderson, M.E.; Loft, S. Minor role of oxidative stress during intermediate phase of acute pancreatitis in rats. *Free radical biology & medicine* **2001**, *30*, 309-317.
269. Leung, P.S.; Chan, Y.C. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxidants & redox signaling* **2009**, *11*, 135-165.
270. Correia, S.; Carvalho, C.; Santos, M.S.; Proença, T.; Nunes, E.; Duarte, A.I.; Monteiro, P.; Seiça, R.; Oliveira, C.R.; Moreira, P.I. Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med Chem* **2008**, *4*, 358-364.
271. Tasci, S.; Senocak, R.; Lapsekili, E.; Kaymak, S.; Yigit, T. The effects of a TNF-alpha inhibitor and HBO combination on the severity of pancreatitis and oxidative response in an experimental model of acute pancreatitis. *Bratisl Lek Listy* **2019**, *120*, 417-422.
272. Barbalho, S.M.; Goulart, R.A.; Batista, G. Vitamin A and inflammatory bowel diseases: from cellular studies and animal models to human disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology* **2019**, *13*, 25-35.
273. Sledzinski, M.; Borkowska, A.; Sielicka-Dudzin, A.; Halon, M.; Wozniak, M.; Spodnik, J.H.; Antosiewicz, A.H.; Antosiewicz, J. Cerulein-Induced Acute Pancreatitis Is Associated With c-Jun NH (2)-Terminal Kinase 1-Dependent Ferritin Degradation and Iron-Dependent Free Radicals Formation. *Pancreas* **2013**, *42*, 1070-1077.
274. Tsai, K.; Wang, S.S.; Chen, T.S.; Kong, C.W.; Chang, F.Y.; Lee, S.D.; Lu, F.J. Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis. *Gut* **1998**, *42*, 850-855.
275. Maléth, J.; Rakonczay, Z., Jr.; Venglovecz, V.; Dolman, N.J.; Hegyi, P. Central role of mitochondrial injury in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Acta Physiol (Oxf)* **2013**, *207*, 226-235.
276. van Dijk, S.M.; Hallensleben, N.D.L.; van Santvoort, H.C.; Fockens, P.; van Goor, H.; Bruno, M.J.; Besselink, M.G. Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials. *Gut* **2017**, *66*, 2024-2032.

277. Papachristou, G.I.; Muddana, V.; Yadav, D.; O'Connell, M.; Sanders, M.K.; Slivka, A.; Whitcomb, D.C. Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II, and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis. *The American journal of gastroenterology* **2010**, *105*, 435-442.
278. Windsor, J.A. Search for prognostic markers for acute pancreatitis. *The Lancet* **2000**, *355*, 1924-1925.
279. da Costa, D.W.; Dijksman, L.M.; Bouwense, S.A.; Schepers, N.J.; Besselink, M.G.; van Santvoort, H.C.; Boerma, D.; Gooszen, H.G.; Dijkgraaf, M.G. Cost-effectiveness of same-admission versus interval cholecystectomy after mild gallstone pancreatitis in the PONCHO trial. *The British journal of surgery* **2016**, *103*, 1695-1703.
280. Johnson, C.; Lévy, P. Detection of gallstones in acute pancreatitis: when and how? *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* **2010**, *10*, 27-32.
281. Unal, Y.; Barlas, A.M. Role of increased immature granulocyte percentage in the early prediction of acute necrotizing pancreatitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **2019**, *25*, 177-182.
282. Farkas, N.; Hanák, L.; Mikó, A.; Bajor, J.; Sarlós, P.; Czimmer, J.; Vincze, Á.; Gódi, S.; Pécsi, D.; Varjú, P., et al. A Multicenter, International Cohort Analysis of 1435 Cases to Support Clinical Trial Design in Acute Pancreatitis. *Front Physiol* **2019**, *10*, 1092.
283. Azab, B.; Jaglall, N.; Atallah, J.P.; Lamet, A.; Raja-Surya, V.; Farah, B.; Lesser, M.; Widmann, W.D. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of adverse outcomes of acute pancreatitis. *Pancreatology* **2011**, *11*, 445-452.
284. Ilhan, M.; Ilhan, G.; Gok, A.F.; Bademler, S.; Verit Atmaca, F.; Ertekin, C. Evaluation of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width-platelet ratio as early predictor of acute pancreatitis in pregnancy. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* **2016**, *29*, 1476-1480.
285. Liu, G.; Tao, J.; Zhu, Z.; Wang, W. The early prognostic value of inflammatory markers in patients with acute pancreatitis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* **2019**, *43*, 330-337.
286. Qi, Q.; Zhuang, L.; Shen, Y.; Geng, Y.; Yu, S.; Chen, H.; Liu, L.; Meng, Z.; Wang, P.; Chen, Z. A novel systemic inflammation response index (SIRI) for predicting the survival of patients with pancreatic cancer after chemotherapy. *Cancer* **2016**, *122*, 2158-2167.
287. Gulen, B.; Sonmez, E.; Yaylaci, S.; Serinken, M.; Eken, C.; Dur, A.; Turkdogan, F.T.; Sogut, O. Effect of harmless acute pancreatitis score, red cell distribution width and neutrophil/lymphocyte ratio on the mortality of patients with nontraumatic acute pancreatitis at the emergency department. *World journal of emergency medicine* **2015**, *6*, 29-33.
288. Gu, L.; Ma, X.; Wang, L.; Li, H.; Chen, L.; Li, X.; Zhang, Y.; Xie, Y.; Zhang, X. Prognostic value of a systemic inflammatory response index in metastatic renal cell carcinoma and construction of a predictive model. *Oncotarget* **2017**, *8*, 52094-52103.

289. Pacheco-Barcia, V.; Mondejar Solis, R.; France, T.; Asselah, J.; Donnay, O.; Zogopoulos, G.; Bouganim, N.; Guo, K.; Rogado, J.; Martin, E., et al. A systemic inflammation response index (SIRI) correlates with survival and predicts oncological outcome for mFOLFIRINOX therapy in metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology* **2019**, 10.1016/j.pan.2019.12.010.
290. Chen, L.; Kong, X.; Wang, Z.; Wang, X.; Fang, Y.; Wang, J. Pretreatment Systemic Inflammation Response Index in Patients with Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy as a Useful Prognostic Indicator. *Cancer management and research* **2020**, 12, 1543-1567.
291. Miglani, R.K.; Bhateja, N.; Bhat, R.S.; Kumar, K.V. Diagnostic Role of Platelet Lymphocyte Ratio(PLR) in Pancreatic Head Masses. *The Indian journal of surgery* **2013**, 75, 4-9.
292. Cho, S.K.; Jung, S.; Lee, K.J.; Kim, J.W. Neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio can predict the severity of gallstone pancreatitis. *BMC Gastroenterol* **2018**, 18, 18.
293. Djordjevic, D.; Rondovic, G.; Surbatovic, M.; Stanojevic, I.; Udovicic, I.; Andjelic, T.; Zeba, S.; Milosavljevic, S.; Stankovic, N.; Abazovic, D., et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Predict Outcome and Nature of Bacteremia? *Mediators Inflamm* **2018**, 2018, 3758068.
294. Wu, B.U.; Hwang, J.Q.; Gardner, T.H.; Repas, K.; Delee, R.; Yu, S.; Smith, B.; Banks, P.A.; Conwell, D.L. Lactated Ringer's solution reduces systemic inflammation compared with saline in patients with acute pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2011**, 9, 710-717.e711.
295. Talamini, G.; Uomo, G.; Pezzilli, R.; Rabitti, P.G.; Billi, P.; Bassi, C.; Cavallini, G.; Pederzoli, P. Serum creatinine and chest radiographs in the early assessment of acute pancreatitis. *American journal of surgery* **1999**, 177, 7-14.
296. Muddana, V.; Whitcomb, D.C.; Khalid, A.; Slivka, A.; Papachristou, G.I. Elevated serum creatinine as a marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* **2009**, 104, 164-170.
297. Cui, J.; Xiong, J.; Zhang, Y.; Peng, T.; Huang, M.; Lin, Y.; Guo, Y.; Wu, H.; Wang, C. Serum lactate dehydrogenase is predictive of persistent organ failure in acute pancreatitis. *Journal of critical care* **2017**, 41, 161-165.
298. Komolafe, O.; Pereira, S.P.; Davidson, B.R.; Gurusamy, K.S. Serum C-reactive protein, procalcitonin, and lactate dehydrogenase for the diagnosis of pancreatic necrosis. *The Cochrane database of systematic reviews* **2017**, 4, Cdo12645.
299. Chen, C.C.; Wang, S.S.; Chao, Y.; Lu, C.W.; Lee, S.D.; Tsai, Y.T.; Lo, K.J. C-reactive protein and lactate dehydrogenase isoenzymes in the assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* **1992**, 7, 363-366.
300. Brunkhorst, F.M.; Eberhard, O.K.; Brunkhorst, R. Early identification of biliary pancreatitis with procalcitonin. *Am J Gastroenterol* **1998**, 93, 1191-1192.

301. Stirling, A.D.; Moran, N.R.; Kelly, M.E.; Ridgway, P.F.; Conlon, K.C. The predictive value of C-reactive protein (CRP) in acute pancreatitis—is interval change in CRP an additional indicator of severity? *Hpb* **2017**, *19*, 874-880.
302. Krause, A.; Neitz, S.; Mägert, H.-J.; Schulz, A.; Forssmann, W.-G.; Schulz-Knappe, P.; Adermann, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters* **2000**, *480*, 147-150.
303. Park, C.H.; Valore, E.V.; Waring, A.J.; Ganz, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 7806-7810.
304. Kali, A.; Charles, M.V.P.; Seetharam, R.S.K. Hepcidin-A novel biomarker with changing trends. *Pharmacognosy reviews* **2015**, *9*, 35.
305. Arnold, J.; Sangwaiya, A.; Manglam, V.; Geoghegan, F.; Thursz, M.; Busbridge, M. Presence of hepcidin-25 in biological fluids: bile, ascitic and pleural fluids. *World journal of gastroenterology: WJG* **2010**, *16*, 2129.
306. D'Angelo, G. Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. *Blood research* **2013**, *48*, 10-15.
307. Yang, Y.X.; Li, L. Evaluating the Ability of the Bedside Index for Severity of Acute Pancreatitis Score to Predict Severe Acute Pancreatitis: A Meta-Analysis. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* **2016**, *25*, 137-142.
308. Marek, G.; Ściskalska, M.; Grzebieniak, Z.; Milnerowicz, H. Decreases in Paraoxonase-1 Activities Promote a Pro-inflammatory Effect of Lipids Peroxidation Products in Non-smoking and Smoking Patients with Acute Pancreatitis. *International journal of medical sciences* **2018**, *15*, 1619-1630.
309. Sajewicz, W.; Milnerowicz, S.; Nabzdyk, S. Blood plasma antioxidant defense in patients with pancreatitis. *Pancreas* **2006**, *32*, 139-144.
310. Batcioglu, K.; Gul, M.; Uyumlu, A.B.; Esrefoglu, M. Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein-induced acute pancreatitis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **2009**, *42*, 776-782.
311. Chou, S.H.; Lan, J.; Esposito, E.; Ning, M.; Balaj, L.; Ji, X.; Lo, E.H.; Hayakawa, K. Extracellular Mitochondria in Cerebrospinal Fluid and Neurological Recovery After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **2017**, *48*, 2231-2237.
312. Armstrong, J.A.; Cash, N.J.; Ouyang, Y.; Morton, J.C.; Chvanov, M.; Latawiec, D.; Awais, M.; Tepikin, A.V.; Sutton, R.; Criddle, D.N. Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift. *The Journal of biological chemistry* **2018**, *293*, 8032-8047.
313. Chan, F.K.; Moriwaki, K.; De Rosa, M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2013**, *979*, 65-70.
314. Jarak, I.; Almeida, S.; Carvalho, R.A.; Sousa, M.; Barros, A.; Alves, M.G.; Oliveira, P.F. Senescence and declining reproductive potential: Insight into molecular mechanisms through testicular metabolomics. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **2018**, *1864*, 3388-3396.

315. Jeurnink, S.M.; Nijs, M.M.; Prins, H.A.; Greving, J.P.; Siersema, P.D. Antioxidants as a treatment for acute pancreatitis: A meta-analysis. *Pancreatology* **2015**, *15*, 203-208.
316. Tang, M.; Hu, G.; Zhao, Y.; Su, M.; Wang, Y.; Jia, W.; Qiu, Y.; Liu, G.; Wang, X. A serum metabolomic investigation on lipoprotein lipase-deficient mice with hyperlipidemic pancreatitis using gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical reports* **2013**, *1*, 469-473.
317. Biczó, G.; Vegh, E.T.; Shalbueva, N.; Mareninova, O.A.; Elperin, J.; Lotshaw, E.; Gretler, S.; Lugea, A.; Malla, S.R.; Dawson, D., et al. Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Deregulated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 689-703.
318. Dong, Y.W.; Jiang, W.D.; Liu, Y.; Wu, P.; Jiang, J.; Kuang, S.Y.; Tang, L.; Tang, W.N.; Zhang, Y.A.; Zhou, X.Q., et al. Threonine deficiency decreased intestinal immunity and aggravated inflammation associated with NF-kappaB and target of rapamycin signalling pathways in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *The British journal of nutrition* **2017**, *118*, 92-108.
319. Huang, S.S.; Lin, J.Y.; Chen, W.S.; Liu, M.H.; Cheng, C.W.; Cheng, M.L.; Wang, C.H. Phenylalanine- and leucine-defined metabolic types identify high mortality risk in patients with severe infection. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **2019**, *85*, 143-149.



## **Lista de publicações relacionadas com a tese**

### **Artigos em revistas com arbitragem científica**

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Murine Models of Acute Pancreatitis: A Critical Appraisal of Clinical Relevance. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(11), 2794. Doi: 10.3390/ijms20112794 (Q1; IF: 4.556)

**Silva-Vaz P.;** Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Multifactorial Scores and Biomarkers of Prognosis of Acute Pancreatitis: Applications to Research and Practice. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(1), 338. Doi: 10.3390/ijms21010338 (Q1; IF: 4.556)

**Silva-Vaz P.;** Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, Morgado-Nunes, S.; M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Evaluation of Prognostic Factors of Severity in Acute Pancreatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(12), 4300. Doi: 10.3390/ijms21124300 (Q1; IF: 4.556)

### **Resumos em revistas com arbitragem científica**

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Oliveira, R.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. 2016. Estudo experimental de modelos animais de pancreatite aguda. Trabalho apresentado no XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia. In *Revista Portuguesa de Cirurgia*, suplemento março 2016, p.124

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R.; Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. 2016. *Score* histológico no modelo murino de pancreatite aguda, Trabalho apresentado no XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia. In *Revista Portuguesa de Cirurgia*, suplemento março 2016, p.123

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R.; Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Severity histologic score of acute pancreatitis in

murine models: preliminary results. Trabalho apresentado no 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club. In *Pancreatology*, Volume 16, Número S3, 2016

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R.; Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Severity histologic score of acute pancreatitis in murine models: preliminary results. Trabalho apresentado no 31<sup>th</sup> European Congress of Pathology. In *Virchows Arch*, Volume 469, Suppl 1, 2016

**Silva-Vaz, P.;** Baldeiras I.; Abrantes A.M.; Oliveira R.O.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. A vitamina A e o stresse oxidativo em modelos murinos de pancreatite aguda. Trabalho apresentado no XXXVII Congresso Nacional de Cirurgia. In *Revista Portuguesa de Cirurgia*, suplemento março 2017, p.70

**Silva-Vaz, P.;** Baldeiras I.; Abrantes A.M.; Oliveira R.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. Vitamin A and Oxidative Stress in Murine Models of Acute Pancreatitis. Trabalho apresentado no 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club. In *Pancreatology*, Volume 17, Number S27, 2017

**Silva-Vaz P.;** Rato L.; Abrantes A.M.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. Evaluation of oxidative stress in acute pancreatitis. Trabalho apresentado no 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club. In *Pancreatology*, Volume 18, Number S168, 2018

**Silva-Vaz P.;** Rato L.; Abrantes A.M.; Alves M.; Nunes S.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. Caracterização do stresse oxidativo na pancreatite aguda. Trabalho apresentado no XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia. In *Revista Portuguesa de Cirurgia*, suplemento março 2019, p.59-60

**Silva-Vaz P.;** Abrantes A.M.; Nunes S.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. A hepcidina sérica como biomarcador de prognóstico da pancreatite aguda. Trabalho apresentado no XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia. In *Revista Portuguesa de Cirurgia*, suplemento março 2019, p.116

**Silva-Vaz P.;** Jarak I.; Oliveira P.F.; Alves M.A.; Rato L.; Abrantes A.M.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. A metabolómica como ferramenta no prognóstico da pancreatite aguda. Trabalho apresentado no XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia. In *Revista Portuguesa de Cirurgia*, suplemento março 2019, p.116



**Silva-Vaz P.;** Rato L.; Abrantes A.M.; Gouveia A.; Castelo-Branco M.; Alves M.A.; Botelho M.F.; Tralhão J.G. Characterization of oxidative stress in acute pancreatitis. Trabalho apresentado no 51<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club. In *Pancreatology*, Volume 19, Number S150, 2019

## **Apresentação oral de trabalhos**

**Silva-Vaz, P.;** Caldeira, A.; Sousa, R.; Gouveia, A.; Banhudo, A.; Loureiro, A. The value of procalcitonin, antithrombin III and BISAP score at predicting the severity of acute pancreatitis, 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club, Zurique, Suíça, 2013 (Poster).

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Tralhão, J.G. Prognostic factors in the assessment of the severity of acute pancreatitis, X Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, 2015 (Comunicação).

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Oliveira, R.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Estudo experimental de modelos animais de pancreatite aguda, XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal, 2016 (Poster).

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Oliveira, R.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Estudo experimental de modelos animais de pancreatite aguda, XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal, 2016 (Comunicação – Prémio melhores E-Poster).

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R.; Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. *Score* histológico no modelo murino de pancreatite aguda, XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal, 2016 (Poster).

**Silva-Vaz, P.** Acute pancreatitis: severity stratification criteria. Mesa Redonda “Pâncreas, vias biliares e ecografia – Pancreatite Aguda”, Semana Digestiva 2016, Algarve, Portugal, 2016 (Palestra).

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Oliveira, R.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Estudo experimental no modelo murino de pancreatite aguda, Semana Digestiva 2016, Algarve, Portugal 2016 (Comunicação).

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R.; Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. *Score* histológico de pancreatite aguda no modelo murino: estudo preliminar, Semana Digestiva 2016, Algarve, Portugal 2016 (Comunicação).

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R. Pancreatitis animal models, Curso avançado em modelos animais de doenças humanas, Faculdade de Medicina, IBILI, Coimbra, Portugal 2016 (Palestra).

**Silva-Vaz, P.;** Oliveira, R.; Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Severity histologic score of acute pancreatitis in murine models: preliminary results, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club, Liverpool, UK 2016 (Poster).

Silva-Vaz, P.; **Oliveira, R.;** Abrantes, A.M.; Encarnação, J.C.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Severity histologic score of acute pancreatitis in murine models: preliminary results, 31<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Nice, França 2016 (Poster).

**Silva-Vaz, P.;** Baldeiras I.; Abrantes, A.M.; Oliveira R.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. A vitamina A e o stresse oxidativo em modelos animais de pancreatite aguda, XXXVII Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz 2017 (Comunicação Oral)

**Silva-Vaz, P.;** Baldeiras I.; Abrantes, A.M.; Oliveira R.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Vitamin A and Oxidative Stress in Murine Modelos of Acute Pancreatitis, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Pancreatic Club, Budapeste 2017 (Poster)

**Silva-Vaz, P.;** Rato L.; Abrantes, A.M.; Oliveira R.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Alves M.G.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Avaliação do stresse oxidativo em doentes com pancreatite aguda, XXXVIII Congresso Nacional de Cirurgia, Lisboa 2018 (Comunicação Oral)

**Silva-Vaz, P.;** Rato L.; Abrantes, A.M.; Oliveira R.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Alves M.G.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Evaluation of oxidative stress in gallstone acute pancreatitis, European Society for Surgical Research 2018 Annual Meeting, Madrid 2018 (Comunicação Oral)

**Silva-Vaz, P.;** Baldeiras I.; Abrantes, A.M.; Oliveira R.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Vitamin A and Oxidative Stress in Murine Models of Acute Pancreatitis, European Society for Surgical Research 2018 Annual Meeting, Madrid 2018 (Poster – Candidate Abstract for Poster Award)

**Silva-Vaz, P.;** Rato L.; Abrantes, A.M.; Alves M.; Nunes S.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Alves M.G.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Caracterização do stresse oxidativo na pancreatite aguda, XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar 2019 (Comunicação Oral)

**Silva-Vaz, P.;** Abrantes, A.M.; Nunes S.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Alves M.G.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. A hepcidina sérica como biomarcador de prognóstico da pancreatite aguda, XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar 2019 (Comunicação Oral)

**Silva-Vaz, P.;** Jarak I.; Oliveira P.F.; Alves M.A.; Rato L.; Abrantes, A.M.; Gouveia, A.; Castelo-Branco, M.; Alves M.G.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. A metabolómica como ferramenta no prognóstico da pancreatite aguda, XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar 2019 (Comunicação Oral)



## Anexos

### Anexo I



AGRICULTURA, FLORESTAS  
E DESENVOLVIMENTO RURAL



2018-07-09 014292

Ex<sup>ma</sup> Senhora  
Professora Ana Margarida Coelho Abrantes  
Faculdade de Medicina da Universidade de  
Coimbra  
Instituto de Biofísica/ICBR  
Azinhaga Santa Comba, Celas  
3000 – 548 COIMBRA

Nossa referência  
0421/000/000  
/2018

Vossa referência

Vossa data

Assunto: **PROTEÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA FINS EXPERIMENTAIS E/OU OUTROS FINS CIENTÍFICOS – PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJECTO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Na sequência do pedido efetuado por V. Ex<sup>a</sup> no sentido de poder ser autorizada a realização do projeto experimental designado “Pancreatite aguda: Novas fronteiras no prognóstico”, de que é a investigadora responsável, cabe-me informar que o mesmo foi avaliado de acordo com o Artigo 44º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à “proteção dos animais utilizados para fins científicos”.

Mais se informa V. Ex<sup>a</sup> que o projeto em apreço recebeu uma **avaliação favorável** e foi **autorizado** de acordo com o nº 1, do Artigo 42º do mesmo diploma legislativo.

No entanto, deverá, fazer-se para cada um dos procedimentos a realizar, uma adequada monitorização dos sinais de dor, sofrimento ou angústia dos animais neles envolvidos, por forma a poder fazer-se uma atualização sobre o nível de dor efetiva a que os mesmos possam vir a ficar sujeitos e, também, para que a aplicação dos limites críticos estabelecidos para cada um dos procedimentos mais invasivos e de maior severidade infligida se faça adequadamente a cada animal.

Assim sendo, e como os procedimentos a realizar são prospetivamente classificados com a categoria de severidade **Moderado** e **Ligeiro**, deverão ser submetidos a uma monitorização que detete, nos animais, sinais indiciantes de sofrimento, dor ou angústia de categoria Severo o que, a acontecer, implicará a sujeição do projeto a uma avaliação retrospectiva, de acordo com o ponto 3, do artigo 45º do Decreto-Lei atrás mencionado.

Finalmente, resta-me especificar, de acordo com o discriminado no nº 2, do Artigo 46º, do atrás referido Decreto-Lei, o seguinte:

- O utilizador que realiza o projeto: Senhor Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- A pessoa responsável pela execução global do projeto e pela sua conformidade com a autorização do mesmo: Professora Ana Margarida Coelho Abrantes;

## Pancreatite Aguda: Novas Fronteiras no Prognóstico



- O estabelecimento onde o projeto vai ser realizado: Biotério de pequenos roedores do IBILI.

Com os melhores cumprimentos,

  
O Diretor Geral

Fernando Bernardo



DBEA/AP



## Anexo II



**Ofício:** Serviço de Cirurgia Geral

**Assunto:** Projecto de Investigação – Avaliação de Marcadores Serológicos no Prognóstico da Pancreatite Aguda

**Requerente:** Dr. Antonio Gouveia - Director do Serviço de Cirurgia Geral da ULSCB e Dr Pedro Vaz, Assistente Hospitalar de Cirurgia Geral

**Título:** Avaliação de Marcadores Serológicos no Prognóstico da Pancreatite Aguda

**Serviço onde decorre o Trabalho:** ULSCB

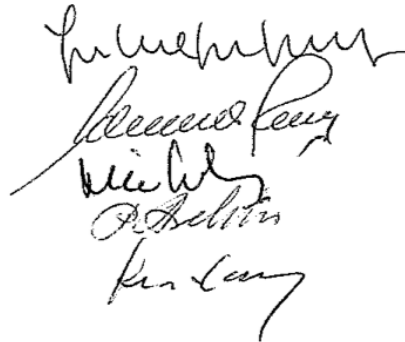
**Investigador Principal:** Dr. Pedro Vaz

**Data do pedido:** Ofício datado no HAL em 08 de Junho de 2015

A Comissão de Ética da ULSCB, concorda com o referido estudo desde que seja mantida a confidencialidade dos sujeitos do mesmo, e que todos os princípios éticos inerentes ao processo de investigação sejam respeitados, desde que autorizados pelos Directores dos respectivos serviços.

ULS de Castelo Branco, E.P.E., 24 de Julho de 2015

A Comissão de Ética



## Anexo III

### Consentimento Informado

Código de identificação do participante: \_\_\_\_\_

O presente estudo intitula-se “**AVALIAÇÃO DE MARCADORES SEROLÓGICOS NO PROGNÓSTICO DA PANCREATITE AGUDA**” e será desenvolvido no Hospital Amato Lusitano da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, EPE. Consiste na avaliação clínica e analítica de doentes com o diagnóstico de Pancreatite Aguda. Será colhido, ao doente, sangue que será armazenado no Biobanco da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, de forma a poder ser avaliados novos marcadores serológicos de prognóstico de gravidade da Pancreatite Aguda. O objetivo deste estudo é a identificação precoce de doentes que poderão desenvolver a forma grave de Pancreatite Aguda permitindo melhorar tanto a abordagem clínica, como terapêutica nesse grupo de doentes.

Para tal necessitamos da sua colaboração e disponibilidade para responder a algumas perguntas clínicas e colher amostras biológicas (sangue). O procedimento relativo à colheita das amostras ser-lhe-á descrito. Caso assim o deseje, poderá recusar participar neste estudo a qualquer altura sem que isso prejudique os seus direitos em termos de assistência médica ou hospitalar.

Os resultados obtidos serão usados única e exclusivamente para fins científicos e **toda a informação relativa a este estudo permanecerá confidencial e anónima**. A sua identidade como participante não será revelada e todas as referências que a possam comprometer serão eliminadas antes da publicação de relatórios ou artigos científicos.

Assim, **declaro que o objetivo deste estudo bem como todos os direitos e deveres me foram explicados, compreendi e consinto participar no presente estudo**, de forma a contribuir na investigação biomédica e que as amostras biológicas sejam utilizadas em projetos de investigação clínica. No entanto, foi-me explicado que poderei revogar a autorização de utilização dos meus dados pessoais, clínicos e das minhas amostras biológicas em qualquer altura. Estou consciente que o objetivo do banco de amostras biológicas me foi claramente explicado e pude colocar questões sobre o seu funcionamento, bem como os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

#### Consentimento de recolha de dados clínicos e biológicos:

Consinto responder ao questionário, fornecendo informações pessoais e clínicas

Consinto a colheita de material biológico, nomeadamente: sangue  e autorizo a conservação de amostras no Biobanco, de modo a que possam ser utilizados para investigação futura, incluindo estudos genéticos e cultura de linhas celulares.



## Consentimento Informado

Aceito que as amostras sejam preservadas para estudos futuros sobre **PANCREATITE AGUDA**. Declaro que compreendi o conteúdo deste consentimento informado e estou de acordo com os procedimentos do estudo, tendo recebido as informações que desejava conhecer e recebi o duplicado deste Consentimento Informado.

Mais declaro que estou consciente que a minha participação no estudo é voluntária e que em qualquer altura se pode solicitar a destruição dos dados pessoais, clínicos e amostra biológica, invalidando assim o consentimento informado prévio, sem justificar, tendo recebido a garantia de que o seu pedido não desenvolverá discriminação.

Participante (Nome Completo)	
Assinatura	Data

Testemunha	
Assinatura	Data

Discuti este estudo de investigação com o participante e/ou o seu representante legal, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente o participante sobre a natureza deste estudo e sobre os seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

Nome do membro da equipa de Investigação:	
Assinatura:	
Local	Data



# Artigos

## Artigo I



International Journal of  
Molecular Sciences



Review

### Murine Models of Acute Pancreatitis: A Critical Appraisal of Clinical Relevance

Pedro Silva-Vaz <sup>1,2,3,\*</sup>, Ana Margarida Abrantes <sup>4,5,6</sup>, Miguel Castelo-Branco <sup>1,3</sup>, António Gouveia <sup>2,3</sup>, Maria Filomena Botelho <sup>4,5,6</sup> and José Guilherme Tralhão <sup>4,5,6,7</sup>

- <sup>1</sup> Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior (CICS-UBI), 6200-506 Covilhã, Portugal; mcbranco@fcsaude.ubi.pt
  - <sup>2</sup> General Surgery Department, Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, 6000-085 Castelo Branco, Portugal; agouveia@ulscb.min-saude.pt
  - <sup>3</sup> Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal
  - <sup>4</sup> Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; mabrantes@fmed.uc.pt (A.M.A.); mfbotelho@fmed.uc.pt (M.F.B.); jglrt@hotmail.com (J.G.T.)
  - <sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal
  - <sup>6</sup> Biophysics and Biomathematics Institute, IBILI-Faculty of Medicine of University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal
  - <sup>7</sup> Surgery Department, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal
- \* Correspondence: pedro.silvavaz@gmail.com; Tel.: +351-966-498-337

Received: 4 May 2019; Accepted: 5 June 2019; Published: 7 June 2019



**Abstract:** Acute pancreatitis (AP) is a severe disease associated with high morbidity and mortality. Clinical studies can provide some data concerning the etiology, pathophysiology, and outcomes of this disease. However, the study of early events and new targeted therapies cannot be performed on humans due to ethical reasons. Experimental murine models can be used in the understanding of the pancreatic inflammation, because they are able to closely mimic the main features of human AP, namely their histologic glandular changes and distant organ failure. These models continue to be important research tools for the reproduction of the etiological, environmental, and genetic factors associated with the pathogenesis of this inflammatory pathology and the exploration of novel therapeutic options. This review provides an overview of several murine models of AP. Furthermore, special focus is made on the most frequently carried out models, the protocols used, and their advantages and limitations. Finally, examples are provided of the use of these models to improve knowledge of the mechanisms involved in the pathogenesis, identify new biomarkers of severity, and develop new targeted therapies.

**Keywords:** acute pancreatitis; animal models; murine; experimental models; biomarkers; inflammation

#### 1. Introduction

Acute pancreatitis (AP), especially severe cases, is a major clinical and financial burden, representing over 320,000 hospital admissions in the United States in 2012 [1]. The incidence of AP ranges from 4.9 to 80 cases per 100,000 persons per year, with equal affinity for each gender [1,2]. The two most common causes of AP are gallstone disease and alcohol [2,3]. The severity and the outcomes are highly variable and unpredictable [4]. Approximately 80% of cases present with mild and interstitial AP. A lower number of patients' courses with a severe form characterized by the presence of persistent organ failure with local and systemic complications associated with a significant morbidity and mortality [5,6]. Mortality in severe form may reach 30% to 50% [1,6,7]. Unfortunately,

the pathophysiology of the AP remains unclear, leading to a lack of effective preventive or therapeutic strategies [8,9].

Evaluating the severity of AP is the major issue that will influence the clinical outcome. Nevertheless, the factors (etiological, environmental, and genetic) that induce severity remain uncertain. The high variability of the severity of AP and the problems in accessing the pancreas in a clinical study have further hindered attempts to clarify its pathophysiology [10]. Therefore, research work using animal models is crucial to increase the understanding of this pathology in order to improve treatments. Since Claude Bernard first debuted the practice in 1856, different animal models have been developed [11], with rodents being the animal most available due to low cost, high reproducibility, mimicking conditions in the human disease [12], and the growing efficiency in manipulating gene structure. An ideal model should be simple and easily reproducible, with the ability to produce controlled severity in order to mimic human disease and answer the experimental question [13]. When performing these models, the researcher should be based on the elevation of pancreatic enzymes, such as amylase and lipase, in order to confirm the induction of AP, taking into account that these enzymes do not reflect the degree of severity. Pancreatitis severity can be assessed by significant histological changes such as interstitial edema, acinar cell death, parenchymal loss, hemorrhage, inflammatory cell infiltration, and vacuolization, and the evaluation of local or systemic complications, with the lung being the organ most involved [14].

In this review, an overview of murine models of AP will be discussed, with special focus on protocols used and their advantages and limitations. Furthermore, examples of the use of these models with the objective of improving the knowledge of the mechanisms involved in the pathogenesis, identifying new biomarkers of severity, and developing new targeted therapies are also provided.

## 2. Applicability of Murine Models to Assess the Severity of Acute Pancreatitis

Banks et al. [6] defined and stratified the severity of AP into three degrees: mild, moderately severe, and severe, based on the absence or presence of persistent organ failure and local or systemic complications. As the severe form is associated with extensive disease characterized by significant pancreatic necrosis and systemic inflammation, which may lead to multiorgan failure and death, the early prediction of severity becomes a major issue in the management of AP.

The severity of AP in murine models is difficult to predict. Nevertheless, some models are associated with mild AP, while others are associated with severe AP (Table 1). The severity of AP is assessed by inflammatory markers and histologic changes. The inflammatory markers most commonly used are protein C-reactive [15], pro-inflammatory cytokines [16,17], tumor necrosis factor- $\alpha$  [18], and procalcitonin [19]. Concerning histological evaluation, Schmidt et al. [20] published the first and most commonly cited scoring system. It uses five parameters: edema, acinar necrosis, hemorrhage and fat necrosis, and inflammation and perivascular infiltrate. Besides pancreatic evaluation (edema, inflammatory infiltration, parenchymal necrosis and hemorrhage), Ding et al. [21] also assessed the liver, kidney, and lung for histological changes. Klopffleisch [22], in his systematic review, analyzed the available histologic scores, concluding that all are based on the Schmidt score having been modified marginally with the omission of a single parameter or including vacuolization as an additional parameter.

However, a severity score related to the Revised Atlanta Classification [6] is not available, to our knowledge, which stratifies murine models of AP in mild, moderately severe, and severe. This tool would be very important to increase the clinical relevance of murine models of AP.

**Table 1.** Animal models for acute pancreatitis according to the severity degree.

AP Classification (According Revised Atlanta Classification [6])	Animals	Models
Mild acute pancreatitis		
- No organ failure	Rats	Hormone-induced model
- No local or systemic complications		
Moderately severe acute pancreatitis		
- Organ failure that resolves within 48 h		-
- Local or systemic complications without persistent organ failure		
	Mice	Hormone-induced model
	Mice and Rats	Closed duodenal loop model *
Severe acute pancreatitis	Mice	Alcohol-induced model *
- Persistent organ failure (>48 h)	Mice and Rats	Nutrient-induced model
- Single organ failure	Mice and Rats	Biliopancreatic duct injection model
- Multiple organ failure	Mice and Rats	Vascular-induced model
	Mice and Rats	Ischemia/Reperfusion model *
	Mice and Rats	Duct ligation model *

The severity of AP is a very important issue for the correct approach of this disease. The choice of the model and animal is crucial for the correct design and answer to the question under study. \* In several studies, the AP severity is very variable.

### 3. Murine Models and the Etiology of Acute Pancreatitis

Gallstones remain the most common cause of AP, while up to 25% to 30% of cases can be attributed to alcohol [7]. Despite these two more frequent etiologies, other factors, in 10% of the cases that are described, can influence the severity, such as endoscopic retrograde cholangiopancreatography [23], renal failure [24], diabetes [25], obesity [26], tobacco [27], drugs and toxins [28], genetic factors [29], trauma [30], autoimmune [31], and hyperlipidemia [32].

Since the pathophysiology of this disease is not well understood, it is fundamental to study each cause of AP in order to understand the underlying mechanisms. In this sense, researchers make a great effort to mimic these clinical etiologic factors in murine models. Studies suggest that murine models have successfully characterized intracellular processes that precede tissue injury.

Due to this, it is important that the researcher has knowledge about each murine model and the clinical etiologic factor that mimics AP to better evaluate the issue that is being addressed (Table 2).

**Table 2.** Animal models for acute pancreatitis according to the etiology and factors.

	Animals	Models
Etiology	Mice and rats	<i>Biliary pancreatitis</i>
		Biliopancreatic duct injection model
		Duct ligation model
		<i>Alcoholic pancreatitis</i>
		Alcohol-induced model
Factors	Mice and rats	<i>Bacterial translocation</i>
		Closed duodenal loop model
		Duct ligation model
		<i>Microcirculation impairment</i>
		Vascular-induced model
		Ischemia/Reperfusion model
		<i>Cholinergic agents</i>
		Hormone-induced model
		<i>Diets</i>
		Nutrient-induced model
		<i>Genetic</i>
		Gene knockout model
		<i>Trauma</i>
Ischemia/Reperfusion model		
Closed duodenal loop model		

Murine models are most commonly used to study AP. In mice and rats, AP (acute inflammation with necrosis and hemorrhage when severe) can be induced by injections of caerulein, alcohol, bile salt infusion, duct ligation, several nutrients such as choline-deficient ethionine-supplemented diet and L-arginine, closed duodenal loop, alterations in genetic animal structure, and changes of pancreatic vascular irrigation. Whether these models produce all the characteristics of human AP remains unclear.

#### 4. Murine Models: A Practical Overview

##### 4.1. Hormone-Induced or Hyperstimulation Acute Pancreatitis Model

Normal pancreatic metabolism is associated with physiological concentrations of secretagogues. AP results from an excess availability of secretagogues, which leads to a high secretion of pancreatic digestive enzymes. One of the most frequently used is caerulein, which is a decapeptide cholecystokinin analogue that stimulates pancreatic secretion. This model histologically simulates the early phase of AP in humans [33]. Mild, interstitial, and edematous pancreatitis was developed by Lampel et al. [34] in rats and severe AP with necrosis of acinar cells was developed by Niederau et al. [35] in mice. The continuous infusion of supramaximal caerulein can be administered intravenously [34,36,37], subcutaneously [38,39], or intraperitoneally [40], with intravenous being the best way of administering the hormone to rats and mice. However, it is not commonly performed due to the requirement of vascular cannulation and anesthesia. This method was modified via intraperitoneal in the lower left or right quadrant of the abdomen. Between one and 12 doses may be given hourly, via subcutaneous or intraperitoneal, to induce AP. Table 3 summarizes the different routes of administration of caerulein, as well as the most commonly used doses. Histologically interstitial edema develops one hour after the infusion, with a maximum after 12 h [34]. This model has been useful for the evaluation of the AP by analyzing the pathophysiology [41–44], severity [45–49], target therapies [50–54], course, outcomes [55], and related pulmonary [56,57] and cardiac [58] injuries. It also mimics the pathophysiology of AP caused by scorpion venom [59] and cholinergic toxins [60] in humans. The exact mechanism by which caerulein induces disease is not totally understood. Studies have shown that caerulein causes an abnormal localization of the zymogen and lysosomal hydrolases that are activated intracellularly within the acinar cells [61]. In its turn, lysosomal cysteine protease cathepsin B appears to be an important factor in the activation of trypsinogen to trypsin [62]. This model has also been used in the study of the identification of new protein alterations and biomarkers [63] characterizing pancreatic inflammatory damage with proteomic [64] and metabolomic [65] analysis. The advantages of this model are its

noninvasiveness, inexpensiveness, rapid induction, and wide reproducibility and applicability. It could also be applied to in vitro research [66], and also be used for evaluating systemic disease progression, since it is an important tool for researching the pulmonary involvement of AP [67,68]. The major disadvantage is that only a mild form is developed, and the clinical relevance is limited.

**Table 3.** Protocols of the most used acute pancreatitis (AP) models in mice and rats. BW: body weight.

AP Model	Animals	Protocols		References	Clinical Relevance
		Administration Route	Doses		
caerulein	mice	intravenous	6 h continuous infusion of 100 µg/kg/h	[37]	- Relevant to understanding the early AP mechanisms - Pulmonary injury mimics the respiratory involvement in humans - Structural changes of acinar cells are similar to human AP - Preserves acinar physiology throughout the experimental disease course - Mimics the pathophysiology of AP caused by scorpion venom and cholinergic toxins in humans
		subcutaneous	7 h of injections at 50 µg/kg	[39]	
		intraperitoneal	8 h of injections of 10 µg/mL, 0.2 mL/mouse) over two consecutive days	[40]	
			7 h of injections at 50 µg/kg	[44,45]	
			50 µg/kg every two hours for five rounds	[42]	
	rats	intravenous	10 h of injections at 50 µg/kg	[41,43]	
			5 µg/kg/h for periods up to 24 h	[34]	
		subcutaneous	3–h continuous infusion of 7.5 µg/kg/h (7.5 µg/kg/h × 3 h)	[36]	
			5 µg/kg/h for 3 h (hourly injection)	[38]	
			Four injections of 20 µg/kg/h hourly	[47,51]	
intraperitoneal	Injection of 10 µg/kg	[50]			
alcohol	mice	oral or intragastric	Two injections of 40 µg/kg at hourly intervals	[46]	
		intraperitoneal	Single intragastric dose of ethanol (6.0 g/kg BW) in NRF2-KO mice	[69]	
	rats	intraperitoneal	Two intraperitoneal injections of ethanol (1.32 g/kg BW) and palmitoleic acid (1.5 mg/kg BW), separated by one hour	[70]	
		intravenous	Bolus of 2 g/kg BW followed by continuous IV alcohol application of 0.365 g/kg BW/h with an additional 3 mL/kg BW saline solution	[71]	
		oral or intragastric	Intragastric bolus of ethanol 2.3 g/kg BW followed by the continuous infusion of 0.365 g/kg BW/h IV	[71]	
intraductal	Injection of 48% ethyl alcohol in a volume of 1 cm <sup>3</sup> into the common biliary duct	[72]			
L-arginine	rats	intraperitoneal	2-h injections of 8%	[73]	
			250–500 mg/100 g BW	[74]	
Duct infusion-induced model	mice	sodium taurocholate	10 µL/min for 5 min of 2.5–5%	[75]	
			rats	sodium taurocholate	5–10 mM with caerulein intravenous 5 µg/kg/h for 6 h
			1 mL/kg of 3% injected over a 60-second period		[78–80]

The most used protocols in AP animal models are described in the sense of helping those who intend to work in murine models. The potential of combining the existing models in the genetically modified murine animals will improve the knowledge of the pathophysiology process underlying AP.

#### 4.2. Alcohol-Induced Acute Pancreatitis Model

One of the major etiologic factors of AP is alcohol. However, it is well documented that AP induced by alcohol alone has been difficult to achieve [81,82]. Foitzik et al. [83] developed a study to evaluate the factors thought to be involved in the pathogenesis of AP associated with alcohol, since alcohol causes pancreatic injury only when combined with other factors such as exocrine hyperstimulation. The most commonly used are secretagogues [82], lipopolysaccharides [84], or palmitoleic acid [70,85]. This model has been used to analyze the effects of alcohol on pancreatic microcirculation, regeneration, and the role of oxidative stress [86]. The alcohol-induced model could be performed via intravenous [71], oral [69,71], intraperitoneal [70], and intraductal [72] administration. Table 3 summarizes the different routes of administration of alcohol, as well as the most commonly used doses. Huang et al. [70] studied the relative importance of oxidative and non-oxidative pathways in mitochondrial dysfunction, pancreatic damage, and the development of alcoholic AP, and whether the deleterious effects of non-oxidative metabolism of alcohol are preventable. This study enabled researching potential specific

treatments via the inhibition of the generation of fatty acid ethyl esters. Kiziler et al. [72] measured markers of oxidative damage in pancreatic tissue, studying how alcohol injures pancreatic parenchyma tissue. They induced AP by the injection of ethyl alcohol into the common biliopancreatic duct. The authors concluded that iron in serum and pancreatic tissue in rats with early-stage AP was associated with several microvascular changes and oxidative pancreatic injury. Schneider et al. [71] showed that the intravenous alcohol-induced pancreatitis offers a valid model. Studies have suggested that alcohol is related with an increase in ischemia damage and have shown the direct damage of the pancreas [87]. This model is relatively simple and can be performed at a low cost. The major disadvantage is the difficulty in reproducing it and its low clinical relevance. The failure to reproduce acute pancreatitis reflects the human condition, and it is necessary to take into account an additional sensitizing factor or a genetic predisposition regarding the development of alcoholic AP.

#### 4.3. Gene Knockout Acute Pancreatitis Model

The gene knockout models played a key role in understanding the relevance of genetic factors in AP. A knockout mouse model provides a more efficient way to study the impact of complete loss of function or the deletion of a gene during disease initiation and progression. The process of targeting gene provides the ability to alter a specific gene in order to better discern its biological role [88]. Mice are currently the most closely related animal to humans, because both species share about 99% of the same genes [89], for which this technique can easily be applied. This animal has the ability to obtain real totipotent embryonic stem cells [90]. Gene knockout in rats is much harder, and has only been possible since 2003 [91]. These models are usually used to evaluate the pathogenesis and outcomes of AP [69]. Venglovecz et al. [43] using aquaporin 1 knockout mice, concluded that aquaporin 1 plays an essential role in pancreatic ductal fluid and bicarbonate secretion, which probably contributes to the increased susceptibility of pancreatic inflammation. Tao et al. [92] studied the role of  $\beta$ -arrestins, which are the regulators and mediators of a G protein-coupled receptor signaling, in pancreatic inflammation. They observed that  $\beta$ -arrestin 1 alleviates AP, and it may be used as a potential therapeutic target. Norkina et al. [93] studied the involvement of the Reg/PAP cell stress gene in the protection or recovery from pancreatic injury. They concluded that Reg/PAP cell stress genes may be protective due to their anti-apoptotic activity. Jancsó et al. [94] used CTRB1-deficient mice to study the role of chymotrypsin in the early phase of AP. They concluded that CTRB1 protects against secretagogue-induced pancreatitis by reducing trypsin activity. This study highlights the role of protease inhibitors in target therapies of AP. The gene knockout models are also an important tool to study the pancreatic inflammation changes and characterized multiorgan failure [95,96]. The gene knockout model is expensive and complex; its major advantage is that by deleting the specific gene under study, its specific function or effect could be analyzed more efficiently.

#### 4.4. Nutrient-Induced Acute Pancreatitis Model

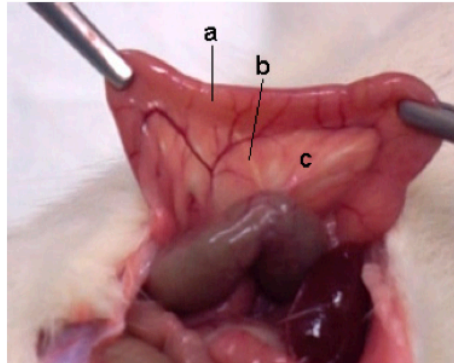
AP induced in rats treated with ethionine was described by Faber and Popper [97]. This model has frequently been used to study the pathogenesis of AP and histologic changes of pancreatic parenchymal cells. Lombardi et al. [98] observed hemorrhagic AP with massive fat necrosis in the peritoneal cavity with a total mortality of mice after a choline-deficient ethionine diet. Although the molecular mechanism remains unclear, a choline-deficient ethionine diet and arginine or other basic amino acids cause severe AP associated with a high mortality [99]. They also showed that a choline-deficient diet without ethionine did not cause pancreatic inflammation or mortality [98]. Guilliland and Steer [100] changed the original model, allowing the gradation of AP severity and mortality in order to further study the outcomes of this disease. The choline-deficient ethionine diet model is widely used since it is a noninvasive model, avoiding exogenous shock. This model was used to evaluate the involvement of pancreatic stellate cells in the development of fibrosis associated to AP [101], and has been used recently to evaluate the signaling pathway that promotes inflammation [96] and new target therapies [102]. The induction of AP can also be achieved with arginine. Mizunuma et al. [103] proposed a model that



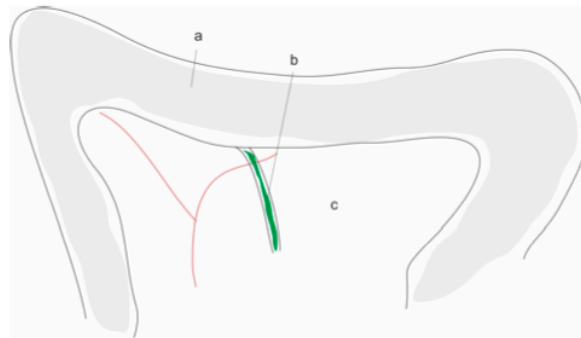
established the intraperitoneal route with L-arginine hydrochloride. Several modifications of this model showed that higher doses can produce high mortality, repeated doses promote necrosis, and reduced doses may delay the time of onset of AP [73,74,104]. Table 3 summarizes the most commonly used doses of L-arginine when administered by the intraperitoneal route. A histological examination revealed degenerative changes to intracellular organelles and the nuclei of acinar cells [105]. Uçmak et al. [106] induced AP with an L-arginine model to investigate the potential effect of silybin, which is a potent antioxidant. They verified that silybin, when used in a prophylactic rather, ameliorates serum oxidative stress parameters. The advantage of this model is its high reproducibility and applicability for researching the different phases of AP and evaluating distant organ injury. The major disadvantage of the arginine-induced AP model is its low clinical relevance, since only two clinical cases of arginine AP in humans are described [107,108].

#### 4.5. Closed Duodenal Loop Acute Pancreatitis Model

In a normal physiological environment, verifying a pressure gradient between the common bile duct and duodenum prevents the duodenopancreatic reflux. The closed duodenal loop model, by changing this normal condition, increases intraduodenal luminal pressure, causing reflux and leading to AP. This model is characterized by the ligation of the duodenum proximal and distal to the union of the common biliopancreatic duct (Figure 1A,B and Figure 2) [109]. The histopathological changes verified with this model consist of intralobular edema, and progressively hemorrhagic pancreatic necrosis [110]. This model is more suitable for the study of pancreatic necrosis as well as for the study of new therapies [110]. Adler, Kern, and Scheele [111] proposed the cannulation of the bile duct to divert the bile away from the duodenum and avoid the involvement of bile in the ensuing pancreatitis, and bile is normally diverted into the jejunum. Several researchers modified this model [112], producing necrohemorrhagic AP. These findings support that the reflux of the duodenal contents into the pancreatic duct is an important mechanism in the development of AP. Other authors [113] instill infected bile or bile sterilized into the duodenum under pressure, producing severe AP. Since this model is associated with a high mortality of the rats, some researchers modified the original model to a temporary ligation of the duodenum [114]. This model is also suitable for the study of bacterial translocation during AP, since the discontinuation of the duodenum leads to functional changes in the mucosal barrier, causing small bowel bacterial overgrowth [115,116]. Sugimoto et al. [117] developed a model of reversible pancreatitis, with an incomplete closed duodenal loop model. They demonstrated that the damage of microcirculation due to tissue ischemia played a role in the increasing severity of AP. This model clarified the role of microcirculation impairment in the pathogenesis of AP, allowing for the research of targeted therapies. The advantage is its simplicity, reproducibility, and use on small animals such as rats. However, the need for surgical intervention, the increased pressure levels verified in the closed duodenal compartment, and the pancreatic duct, as well as the controversial role of bacterial infection, make this model not widely used in scientific research. However, this model has clinical relevance, since there are cases of AP associated with duodenal obstruction in medical literature [118].



A



B

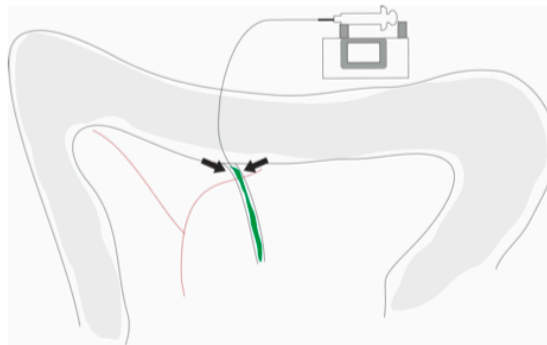
**Figure 1.** (A) Rat pancreas anatomy. Image: The pancreas of an adult rat showing the duodenum and common biliopancreatic duct. Rodent pancreas is soft and diffuse compared with the human pancreas. Photo provided by authors lab. a- duodenum; b- common biliopancreatic duct; c- pancreas. (B) Schematic showing the anatomy of rat pancreas. Image: picture showing the schematic anatomy of the pancreas, duodenum, and common biliopancreatic duct. a- duodenum; b- common biliopancreatic duct; c- pancreas.



**Figure 2.** Closed duodenal loop acute pancreatitis model. Image: picture showing the location of the closed loop of the duodenum. According to aseptic techniques, the duodenum is exposed by a laparotomy, the common biliopancreatic duct is identified, and the duodenum is obstructed by the placement of two ligatures: one just beyond the pylorus—that is, proximally to the duct—and the second placed distally to the duct (arrows).

#### 4.6. Biliopancreatic Duct Injection Acute Pancreatitis Model

The dissection of the pancreatic duct and its cannulation provides an alternative way of inducing an experimental AP model. The original model was developed in cats, in 1979, by Reber et al. [119]. Several modifications were made in order to reduce the degree of technical difficulty. The most common surgical technique (Figure 3) consists of a duodenotomy, which is a retrograde injection of bile salts (with or without activated pancreatic enzymes) into the pancreatic duct at the ampulla that leads to severe AP [120]. To induce AP, some compounds infused into the pancreatic duct are used, such as sodium glycodeoxycholic [20] and sodium taurocholate [78,79,121–123] being the last the most used, because it is thought to be the one that most resembles clinical biliary pancreatitis [124]. This bile salt can also be used to induce biliary AP with multiple organ failure. The severity of AP can be obtained by changing either the pressure or the concentration of the bile salt that is used. The severe form is characterized by edema, necrosis, and hemorrhage. The infusion of solution sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis with mortality range between 24–100% [75–77,80,125,126]. Table 3 summarizes the different doses of sodium taurocholate that are most commonly used. This model is appropriate to study both local and systemic complications of AP, and it can be used to study target therapies. To improve its limitations, this model was changed by combining low-dose intraductal glycodeoxycholic acid with intravenous caerulein [20]. The severity achieved with this model is similar to human disease, and for this reason, it could be used for the study of AP pathogenesis [127,128] and target therapies [129]. This is an easy and reproducible model for severe AP. However, an important limitation is its clinical and pathogenic relevance due to the questionable role of duodenal reflux in the pathogenesis of AP. Another disadvantage is the impossibility of quantifying the pressure with which the solution is applied to cause AP.



**Figure 3.** Biliopancreatic duct injection acute pancreatitis model. Image: picture showing the retrograde ductal infusion technique. According to aseptic techniques, the duodenum is exposed by a laparotomy, and the common biliopancreatic duct is identified and cannulated; after the retrograde infusion, the duct is ligated (arrows).

#### 4.7. Vascular-Induced Acute Pancreatitis Model

Pancreatic microcirculatory failure is the major cause of mortality in severe AP, and is thought to be crucial in the early events of AP with multiple organ dysfunction syndrome [130]. The decrease of pancreatic microcirculatory blood flow volume and velocity, and the increase of microvascular permeability lead to pancreas edema and inflammatory infiltration in the early phase of AP [131]. In 1962, Pfeffer et al. [132] found that different degrees of occlusion of the pancreatic microcirculation cause different pancreatic changes, from edema to acute hemorrhagic, necrotizing pancreatitis. This is particularly useful in the study of coagulopathy and the thrombosis of microvessels [133]. Liu et al. [134] studied the effect of vascular bradykinin on pancreatic microcirculation in rats with severe AP. They concluded that vascular bradykinin can improve pancreatic microcirculation. In addition, several studies have been performed to occlude pancreatic arteries [135] and veins [136]. The advantage of

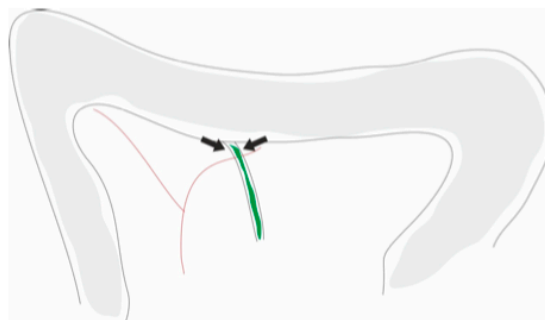
the vascular model is that it is relatively inexpensive, although it does not reliably induce the same degree of severity of AP. However, it is important for studying microcirculatory disorders such as coagulopathy or microvascular thrombosis. The disadvantages are the dramatic surgical trauma exerted upon the animals, the need for a tight protocol, and specific surgical resources.

#### 4.8. Ischemia/Reperfusion Acute Pancreatitis Model

The role of ischemic injury as a cause of AP is well known. Some studies have shown a correlation between the impairment of pancreatic microcirculation and the degree of ischemic injury. Pancreatic microcirculation is the target of reperfusion injury after ischemic. Hoffman et al. [137] developed a model of complete ischemic/reperfusion of the pancreas in rat, causing pancreatic microvascular failure. The severity of changes depends on the duration of ischemia and reperfusion. Dembinski et al. [138] induced AP by clamping the inferior splenic artery for 30 minutes. They induced necrotizing AP with subsequent regeneration within a few weeks. The ischemic/reperfusion model has been used for the study of target therapies such as obestatin [139] and ghrelin [140] and for the study of several biomarkers [141]. The major disadvantages of this model include its reproducibility, being incomplete ischemia, and the inability to measure the remaining pancreatic blood supply. The irreversible ischemia makes this model unsuitable for reperfusion studies. Furthermore, it is difficult to achieve the quantitative analysis of the post-ischemic reperfusion failure.

#### 4.9. Duct Ligation Acute Pancreatitis Model

AP may be induced by ligating the distal bile duct at the level of the duodenum (Figure 4). The first report that associated this model to changes in the exocrine function of the pancreas refers to Churg et al. [142]. This model was used by several researchers to study the pathogenesis [143] and target therapies [144,145], and was developed in an attempt to mimic the clinical situation of a gallstone that obstructed the ampullary orifice with the consequent reflux of bile into the pancreatic duct that lead to AP. In rats, the initial changes such as edema, inflammation, and hyperamylasemia are compatible with AP [146]. This model also induces obstructive hepatic cholestasis and hepatic cholangitis in rats. However, in order to improve this model, some changes were made, namely the combination of pancreatic duct ligation and secretory stimulation, such as caerulein or sodium taurocholate. Studies have shown that in the duct ligation model in rats, the predominant mechanism of cell death is apoptosis. This model may be suitable for the study of bacterial translocation, since the obstruction of bile flow into the intestine causes small bowel bacterial overgrowth [116]. The exclusion of the pancreatic proteases in the gut lumen also alters the intestinal permeability [147]. The advantage of the duct ligation model is that it avoids artificial drug usage, which may produce unwanted systemic effects, as well as the theory relating to clinical biliary AP with biliary pancreatic reflux. However, this is a complex and technically difficult model, and has an associated high cost.



**Figure 4.** Image: picture showing the site of ligation of the common biliopancreatic duct in the rat. According to aseptic techniques, the duodenum is exposed by a laparotomy; the common biliopancreatic duct is identified and ligated at the level of the duodenum (arrows).

## 5. Clinical Relevance of the Models and Future Directions

Personalized medicine has become a major research topic in the scientific community. This approach will, in the patient's prolonged life, improve their quality in the future, bringing new challenges to health care. This prolonged lifetime will increase the incidence of AP as well as more severe forms associated with the patient's clinical condition and its comorbidities. This scenario makes the deepening knowledge of the pathophysiology of AP extremely important. Although the clinical relevance of murine models of AP is a controversial subject, they have contributed greatly to the elucidation of the pathophysiology of this important disease.

The clinical presentation of AP is very variable, from mild to moderately severe and severe, with the latter characterized by the persistence of multiorgan failure [6]. Severe AP associated with infected necrosis represents a very high morbidity and mortality. The actual management of severe AP is based on intravenous fluid therapy [148,149], pain control [150], and adequate nutrition [151], utilizing all of these is the best way to prevent early deaths. In cases of infected necrotizing pancreatitis, an endoscopic or surgical step-up approach is evaluated according to each patient and clinical condition [152]. The complexity of AP in human patients is very high, making it difficult for any of the murine animal models available to develop the disease with all the features comparable to human disease. This is true: since predicting the AP severity of each model is difficult, most studies do not stratify animals into moderately severe forms, and there is no severity histologic score that stratifies animals into the three degrees of AP severity. This issue is of extreme importance, since it will allow a more adequate translation of outcomes, and will influence the methodology adopted in each study in the context of the question being addressed.

However, murine models will continue to be an indispensable tool for the study of AP; they will also improve the outcomes of this condition in humans, not only in the field of prevention, but also in attempting new targeted therapies. Unfortunately, most of the results achieved in these models are not confirmed when translated to human studies.

The choice of the best model is fundamental, and should be based either on the etiology or on the risk factors that might modulate disease severity, always keeping in mind the goal of the research.

## 6. Conclusions

In order to circumvent the limitations and maximize the advantages of each murine model, improvements and combinations of the models have been made to reproduce the disease in humans. These models should attempt to replicate the mechanisms and processes underlying the disease, examine therapeutic interventions, and analyze basic characteristics of acute injury, inflammation, or tissue reconstitution. However, at the present time, none of the existing murine models of AP are totally acceptable. Murine models have considerably contributed to the understanding of the pathophysiologic mechanisms of AP. Therefore, further elaboration of protocols is needed to improve and facilitate the choice of a specific model for a specific question. In this sense, it is essential to invest in the translational research, since these models are an important tool for improving medical care and outcomes for patients with AP.

**Author Contributions:** P.S.V. and A.M.A. read articles of murine animal models of acute pancreatitis. P.S.V. wrote the review. P.S.V., A.M.A., M.C.-B., A.G., M.F.B., J.G.T. read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments:** P.S.V. is grateful to the members of my research group for their discussion and suggestions during the course of this review. This research was funded by FCT, Portugal (Strategic Project PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Garg, S.K.; Sarvepalli, S.; Campbell, J.P.; Obaitan, I.; Singh, D.; Bazerbachi, F.; Singh, R.; Sanaka, M.R. Incidence, Admission Rates, and Predictors, and Economic Burden of Adult Emergency Visits for Acute Pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2019**, *53*, 220–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Garber, A.; Frakes, C.; Arora, Z.; Chahal, P. Mechanisms and Management of Acute Pancreatitis. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2018**, *2018*, 6218798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jha, R.K.; Ma, Q.; Sha, H.; Palikhe, M. Acute pancreatitis: A literature review. *Med Sci. Monit.* **2009**, *15*, RA147–RA156. [[PubMed](#)]
- Ikeura, T.; Horibe, M.; Sanui, M.; Sasaki, M.; Kuwagata, Y.; Nishi, K.; Kariya, S.; Sawano, H.; Goto, T.; Hamada, T. Validation of the efficacy of the prognostic factor score in the Japanese severity criteria for severe acute pancreatitis: A large multicenter study. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2017**, *5*, 389–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frossard, J.L.; Steer, M.L.; Pastor, C.M. Acute pancreatitis. *Lancet* **2008**, *371*, 143–152. [[CrossRef](#)]
- Banks, P.A.; Bollen, T.L.; Dervenis, C.; Gooszen, H.G.; Johnson, C.D.; Sarr, M.G.; Tsiotos, G.G.; Vege, S.S.; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis—2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* **2013**, *62*, 102–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shah, A.P.; Mourad, M.M.; Bramhall, S.R. Acute pancreatitis: Current perspectives on diagnosis and management. *J. Inflamm. Res.* **2018**, *11*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kambhampati, S.; Park, W.; Habtezion, A. Pharmacologic therapy for acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 16868. [[CrossRef](#)]
- Gukovskaya, A.S.; Pandol, S.J.; Gukovsky, I. New insights into the pathways initiating and driving pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2016**, *32*, 429–435. [[CrossRef](#)]
- Steer, M.L. Search for the trigger mechanism of pancreatitis. *Gastroenterology* **1984**, *86*, 764–766.
- Bernard, C. *Leçons de Physiologie Expérimentale Appliquée à la Médecine, Faites au Collège de France par M. Claude Bernard: Cours du Semestre d'été 1855*; Baillière: Paris, France, 1856; Volume 2.
- Gorelick, F.S.; Lerch, M.M. Do animal models of acute pancreatitis reproduce human disease? *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *4*, 251–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Su, K.H.; Cuthbertson, C.; Christophi, C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB* **2006**, *8*, 264–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Samanta, J.; Singh, S.; Arora, S.; Muktesh, G.; Aggarwal, A.; Dhaka, N.; Sinha, S.K.; Gupta, V.; Sharma, V.; Kochhar, R. Cytokine profile in prediction of acute lung injury in patients with acute pancreatitis. *Pancreatol.* **2018**, *18*, 878–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, K.-L.; Lv, Z.-Y.; Yang, H.-W.; Liu, Y.; Long, F.-W.; Zhou, B.; Sun, X.-F.; Peng, Z.-H.; Zhou, Z.-G.; Li, Y. Effects of tocilizumab on experimental severe acute pancreatitis and associated acute lung injury. *Crit. Care Med.* **2016**, *44*, e664–e677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, J.; Ma, X.; Chen, W.; Yang, N.; Gao, L.; Mao, W.; Yang, J.; Yang, Q.; Dong, J.; Tong, Z. Protective effects of HTD4010, a Reg3 $\alpha$ /PAP-derived peptide, in mouse model of acute pancreatitis via toll-like receptor 4 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *512*, 670–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khurana, A.; Sikha, M.S.; Ramesh, K.; Venkatesh, P.; Godugu, C. Modulation of cerulein-induced pancreatic inflammation by hydroalcoholic extract of curry leaf (*Murraya koenigii*). *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 1510–1525. [[CrossRef](#)]
- Yu, W.-Q.; Zhang, S.-Y.; Fu, S.-Q.; Fu, Q.-H.; Lu, W.-N.; Zhang, J.; Liang, Z.-Y.; Zhang, Y.; Liang, T.-B. Dexamethasone protects the glycocalyx on the kidney microvascular endothelium during severe acute pancreatitis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2019**, *20*, 355–362. [[CrossRef](#)]
- Soyalp, M.; Yalcin, M.; Oter, V.; Ozgonul, A. Investigation of procalcitonin, IL-6, oxidative stress index (OSI) plasma and tissue levels in experimental mild and severe pancreatitis in rats. *Bratisl. Lek. Listy* **2017**, *118*, 137–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schmidt, J.; Rattner, D.W.; Lewandrowski, K.; Compton, C.C.; Mandavilli, U.; Knoefel, W.T.; Warshaw, A.L. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann. Surg.* **1992**, *215*, 44–56. [[CrossRef](#)]
- Ding, S.-P.; Li, J.-C.; Jin, C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 584–589. [[CrossRef](#)]

22. Klopfleisch, R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology—a systematic review. *BMC Vet. Res.* **2013**, *9*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Luo, H.; Wang, X.; Zhang, R.; Liang, S.; Kang, X.; Zhang, X.; Lou, Q.; Xiong, K.; Yang, J.; Si, L. Rectal Indomethacin and Spraying of Duodenal Papilla with Epinephrine Increases Risk of Pancreatitis Following Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lerch, M.; Hoppe-Seyler, P.; Gerok, W. Origin and development of exocrine pancreatic insufficiency in experimental renal failure. *Gut* **1994**, *35*, 401–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yao, S.; Li, J.; Fan, X.; Liu, Q.; Lian, J. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on risk of type II diabetes mellitus and acute pancreatitis: A meta-analysis. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Singh, R.G.; Pendharkar, S.A.; Cervantes, A.; Cho, J.; Miranda-Soberanis, V.; Petrov, M.S. Abdominal obesity and insulin resistance after an episode of acute pancreatitis. *Dig. Liver Dis.* **2018**, *50*, 1081–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Barreto, S.G. How does cigarette smoking cause acute pancreatitis? *Pancreatology* **2016**, *16*, 157–163. [[CrossRef](#)]
28. Schneider, L.; Jabrailova, B.; Soliman, H.; Hofer, S.; Strobel, O.; Hackert, T.; Büchler, M.W.; Werner, J. Pharmacological cholinergic stimulation as a therapeutic tool in experimental necrotizing pancreatitis. *Pancreas* **2014**, *43*, 41–46. [[CrossRef](#)]
29. Martins, F.d.O.; Gomes, B.C.; Rodrigues, A.S.; Rueff, J. Genetic susceptibility in acute pancreatitis: Genotyping of GSTM1, GSTT1, GSTP1, CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, LTA, TNFRSF1B, and TP53 gene variants. *Pancreas* **2017**, *46*, 71–76. [[CrossRef](#)]
30. Khaoula, Y.; Mokni, J.; Feten, A.; Ameni, B.; Chedly, M. Blunt abdominal trauma causing acute pancreatitis: Presentation of the case study. *Pan Afr. Med J.* **2018**, *30*, 126.
31. Vujasinovic, M.; Valente, R.; Maier, P.; von Beckerath, V.; Haas, S.L.; Arnelo, U.; Del Chiaro, M.; Kartalis, N.; Pozzi-Mucelli, R.M.; Fernandez-Moro, C. Diagnosis, treatment and long-term outcome of autoimmune pancreatitis in Sweden. *Pancreatology* **2018**, *18*, 900–904. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, G.; Feng, J.; Xu, Q.; Huang, H. Double filtration plasmapheresis in treatment of hyperlipidemic acute pancreatitis. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2008**, *37*, 93–96. [[PubMed](#)]
33. Dabrowski, A.; Konturek, S.J.; Konturek, J.W.; Gabryelewicz, A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *377*, 1–11. [[CrossRef](#)]
34. Lampel, M.; Kern, H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A* **1977**, *373*, 97–117. [[CrossRef](#)]
35. Niederau, C.; Ferrell, L.D.; Grendell, J.H. Caerulein-Induced Acute Necrotizing Pancreatitis in Mice; Protective Effects of Proglumide, Benzotript, and Secretin. *Gastroenterology* **1985**, *88*, 1192–1204. [[CrossRef](#)]
36. Wisner, J.; Green, D.; Ferrell, L.; Renner, I. Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats. *Gut* **1988**, *29*, 1516–1523. [[CrossRef](#)]
37. Hartwig, W.; Schimmel, E.; Hackert, T.; Fortunato, F.; Bergmann, F.; Baczako, A.; Strobel, O.; Büchler, M.W.; Werner, J. A novel animal model of severe pancreatitis in mice and its differences to the rat. *Surgery* **2008**, *144*, 394–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Clemons, A.P.; Holstein, D.M.; Galli, A.; Saunders, C. Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059. *Pancreas* **2002**, *25*, 251–259. [[CrossRef](#)]
39. Niederau, C.; Ude, K.; Niederau, M.; Lüthen, R.; Strohmeyer, G.; Ferrell, L.D.; Grendell, J.H. Effects of the seleno-organic substance Ebselen in two different models of acute pancreatitis. *Pancreas* **1991**, *6*, 282–290. [[CrossRef](#)]
40. Siveke, J.T.; Lubeseder-Martellato, C.; Lee, M.; Mazur, P.K.; Nakhai, H.; Radtke, F.; Schmid, R.M. Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 544–555.e543. [[CrossRef](#)]
41. Xing, M.; Ni, J.B.; Wan, R.; Tang, M.C.; Hu, Y.L.; Yu, G.; Yin, G.J.; Chen, C.Y.; Fan, Y.T.; Xiao, W.Q. Tetraspanin CD 9 is involved in pancreatic damage during caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *J. Dig. Dis.* **2015**, *16*, 43–51. [[CrossRef](#)]
42. Jia, R.; Ma, J.; Meng, W.; Wang, N. Dihydromyricetin inhibits caerulein-induced TRAF3-p38 signaling activation and acute pancreatitis response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *503*, 1696–1702. [[CrossRef](#)]

43. Venglovecz, V.; Pallagi, P.; Kemény, L.; Balázs, A.; Balla, Z.; Becskeházi, E.; Gál, E.; Zvara, Á.; Puskás, L.; Katalin, B. The Importance of Aquaporin 1 in Pancreatitis and Its Relation to the CFTR Cl-Channel. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 854. [[CrossRef](#)]
44. Gao, L.; Lu, G.T.; Lu, Y.Y.; Xiao, W.M.; Mao, W.J.; Tong, Z.H.; Yang, N.; Li, B.Q.; Yang, Q.; Ding, Y.B.; et al. Diabetes aggravates acute pancreatitis possibly via activation of NLRP3 inflammasome in db/db mice. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 2015–2025.
45. Zhang, L.; Zhang, J.; Shea, K.; Xu, L.; Tobin, G.; Knapton, A.; Sharron, S.; Rouse, R. Autophagy in pancreatic acinar cells in cerulein-treated mice: Immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis. *Toxicol. Pathol.* **2014**, *42*, 435–457. [[CrossRef](#)]
46. Sledzinski, M.; Borkowska, A.; Sielicka-Dudzin, A.; Halon, M.; Wozniak, M.; Spodnik, J.H.; Antosiewicz, A.H.; Antosiewicz, J. Cerulein-Induced Acute Pancreatitis Is Associated With c-Jun NH (2)-Terminal Kinase 1-Dependent Ferritin Degradation and Iron-Dependent Free Radicals Formation. *Pancreas* **2013**, *42*, 1070–1077. [[CrossRef](#)]
47. García-Hernández, V.; Sarmiento, N.; Sánchez-Bernal, C.; Matellán, L.; Calvo, J.J.; Sanchez-Yaguee, J. Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 192–201. [[CrossRef](#)]
48. Liu, R.; Qi, H.; Wang, J.; Wang, Y.; Cui, L.; Wen, Y.; Yin, C. Angiotensin-converting enzyme (ACE and ACE2) imbalance correlates with the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Exp. Physiol.* **2014**, *99*, 651–663. [[CrossRef](#)]
49. Ou, X.; Cheng, Z.; Liu, T.; Tang, Z.; Huang, W.; Szatmary, P.; Zheng, S.; Sutton, R.; Toh, C.H.; Zhang, N. Circulating histone levels reflect disease severity in animal models of acute pancreatitis. *Pancreas* **2015**, *44*, 1089–1095. [[CrossRef](#)]
50. Szentkereszty, Z.; Kotan, R.; Kiss, F.; Klarik, Z.; Posan, J.; Furka, I.; Sapy, P.; Miko, I.; Peto, K.; Nemeth, N. Effects of various drugs (flunixin, pentoxifylline, enoxaparin) modulating micro-rheological changes in cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2014**, *57*, 303–314.
51. Cao, J.; Liu, Q. Protective effects of sivelestat in a cerulein-induced rat acute pancreatitis model. *Inflammation* **2013**, *36*, 1348–1356. [[CrossRef](#)]
52. Bae, G.-S.; Heo, K.-H.; Park, K.-C.; Choi, S.B.; Jo, I.-J.; Seo, S.-H.; Kim, D.-G.; Shin, J.-Y.; Kang, D.-G.; Lee, H.-S. Apamin attenuated cerulein-induced acute pancreatitis by inhibition of JNK pathway in mice. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 2908–2917. [[CrossRef](#)]
53. Huang, W.; Cash, N.; Wen, L.; Szatmary, P.; Mukherjee, R.; Armstrong, J.; Chvanov, M.; Tepikin, A.V.; Murphy, M.P.; Sutton, R. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone in murine acute pancreatitis. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 901780. [[CrossRef](#)]
54. Huang, W.; Cane, M.C.; Mukherjee, R.; Szatmary, P.; Zhang, X.; Elliott, V.; Ouyang, Y.; Chvanov, M.; Latawiec, D.; Wen, L. Caffeine protects against experimental acute pancreatitis by inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release. *Gut* **2017**, *66*, 301–313. [[CrossRef](#)]
55. Schick, V.; Scheiber, J.A.; Mooren, F.C.; Turi, S.; Ceyhan, G.O.; Schneckeburger, J.; Sandler, M.; Schwaiger, T.; Omercevic, A.; van den Brandt, C. Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis. *Gut* **2014**, *63*, 1469–1480. [[CrossRef](#)]
56. Wang, Y.Z.; Zhang, Y.C.; Cheng, J.S.; Ni, Q.; Li, P.J.; Wang, S.W.; Han, W.; Zhang, Y.L. BML-111, a lipoxin receptor agonist, ameliorates ‘two-hit’-induced acute pancreatitis-associated lung injury in mice by the upregulation of heme oxygenase-1. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2014**, *42*, 110–120. [[CrossRef](#)]
57. Weng, T.-I.; Wu, H.-Y.; Chen, B.-L.; Jhuang, J.-Y.; Huang, K.-H.; Chiang, C.-K.; Liu, S.-H. C/EBP homologous protein deficiency aggravates acute pancreatitis and associated lung injury. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 7097–7105. [[CrossRef](#)]
58. Marciniak, A.; Walczyna, B.; Rajtar, G.; Marciniak, S.; Wojtak, A.; Lasiecka, K. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, exhibits anti-inflammatory and cardioprotective effects in the cerulein-induced pancreatitis rat model. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 4139851. [[CrossRef](#)]
59. Bartholomew, C. Acute scorpion pancreatitis in Trinidad. *Br. Med. J.* **1970**, *1*, 666–668. [[CrossRef](#)]
60. Marsh, W.H.; Vukov, G.A.; Conradi, E.C. Acute pancreatitis after cutaneous exposure to an organophosphate insecticide. *Am. J. Gastroenterol.* **1988**, *83*, 1158–1160.
61. Steer, M.L.; Meldolesi, J. The cell biology of experimental pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 144–150.



62. Steer, M.L. Frank Brooks memorial Lecture: The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas* **1998**, *17*, 31–37. [[CrossRef](#)]
63. Norberg, K.J.; Nania, S.; Li, X.; Gao, H.; Szatmary, P.; Segersvärd, R.; Haas, S.; Wagman, A.; Arnelo, U.; Sutton, R. RCAN1 is a marker of oxidative stress, induced in acute pancreatitis. *Pancreatology* **2018**, *18*, 734–741. [[CrossRef](#)]
64. García-Hernández, V.; Sánchez-Bernal, C.; Schwartz, D.; Calvo, J.J.; Sanchez, J.-C.; Sánchez-Yagüe, J. A tandem mass tag (TMT) proteomic analysis during the early phase of experimental pancreatitis reveals new insights in the disease pathogenesis. *J. Proteom.* **2018**, *181*, 190–200. [[CrossRef](#)]
65. Tang, M.; Hu, G.; Zhao, Y.; Su, M.; Wang, Y.; Jia, W.; Qiu, Y.; Liu, G.; Wang, X. A serum metabolomic investigation on lipoprotein lipase-deficient mice with hyperlipidemic pancreatitis using gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Rep.* **2013**, *1*, 469–473. [[CrossRef](#)]
66. Cai, Y.; Shen, Y.; Xu, G.; Tao, R.; Yuan, W.; Huang, Z.; Zhang, D. TRAM1 protects AR42J cells from caerulein-induced acute pancreatitis through ER stress-apoptosis pathway. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2016**, *52*, 530–536. [[CrossRef](#)]
67. Terao, K.; Wake, H.; Adachi, N.; Liu, K.; Teshigawara, K.; Takahashi, H.; Mori, S.; Nishibori, M. Histidine-Rich Glycoprotein Suppresses Hyperinflammatory Responses of Lung in a Severe Acute Pancreatitis Mouse Model. *Pancreas* **2018**, *47*, 1156–1164. [[CrossRef](#)]
68. Sun, K.; He, S.-B.; Qu, J.-G.; Dang, S.-C.; Chen, J.-X.; Gong, A.-H.; Xie, R.; Zhang, J.-X. IRF5 regulates lung macrophages M2 polarization during severe acute pancreatitis in vitro. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 9368. [[CrossRef](#)]
69. Sun, J.; Fu, J.; Zhong, Y.; Li, L.; Chen, C.; Wang, X.; Wang, L.; Hou, Y.; Wang, H.; Zhao, R. NRF2 mitigates acute alcohol-induced hepatic and pancreatic injury in mice. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *121*, 495–503. [[CrossRef](#)]
70. Huang, W.; Booth, D.M.; Cane, M.C.; Chvanov, M.; Javed, M.A.; Elliott, V.L.; Armstrong, J.A.; Dingsdale, H.; Cash, N.; Li, Y. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. *Gut* **2014**, *63*, 1313–1324. [[CrossRef](#)]
71. Schneider, L.; Dieckmann, R.; Hackert, T.; Gebhard, M.-M.; Werner, J. Acute alcohol-induced pancreatic injury is similar with intravenous and intragastric routes of alcohol administration. *Pancreas* **2014**, *43*, 69–74. [[CrossRef](#)]
72. Kiziler, A.R.; Aydemir, B.; Gulyasar, T.; Unal, E.; Gunes, P. Relationships among iron, protein oxidation and lipid peroxidation levels in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *124*, 135–143. [[CrossRef](#)]
73. Kui, B.; Balla, Z.; Vasas, B.; Végh, E.T.; Pallagi, P.; Kormányos, E.S.; Venglovecz, V.; Iványi, B.; Takács, T.; Hegyi, P. New insights into the methodology of L-arginine-induced acute pancreatitis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117588. [[CrossRef](#)]
74. Tashiro, M.; Schäfer, C.; Yao, H.; Ernst, S.; Williams, J. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut* **2001**, *49*, 241–250. [[CrossRef](#)]
75. Le, T.; Eisses, J.F.; Lemon, K.L.; Ozolek, J.A.; Pociask, D.A.; Orabi, A.I.; Husain, S.Z. Intra-ductal infusion of taurocholate followed by distal common bile duct ligation leads to a severe, necrotic model of pancreatitis in mice. *Pancreas* **2015**, *44*, 493–499.
76. Zhao, Q.; Zhang, H.; Huang, J.; Yu, H.; Li, J.; Che, Q.; Sun, Y.; Jin, Y.; Wu, J. Melatonin attenuates the inflammatory response via inhibiting the C/EBP homologous protein-mediated pathway in taurocholate-induced acute pancreatitis. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *42*, 3513–3521. [[CrossRef](#)]
77. Aho, H.; Koskensalo, S.-L.; Nevalainen, T. Experimental pancreatitis in the rat: Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **1980**, *15*, 411–416. [[CrossRef](#)]
78. Hua, J.; He, Z.-G.; Qian, D.-H.; Lin, S.-P.; Gong, J.; Meng, H.-B.; Yang, T.-S.; Sun, W.; Xu, B.; Zhou, B. Angiopietin-1 gene-modified human mesenchymal stem cells promote angiogenesis and reduce acute pancreatitis in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 3580–3595.
79. Kim, H.-W.; Song, W.-J.; Li, Q.; Han, S.-M.; Jeon, K.-O.; Park, S.-C.; Ryu, M.-O.; Chae, H.-K.; Kyeong, K.; Youn, H.-Y. Canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate severe acute pancreatitis by regulating T cells in rats. *J. Vet. Sci.* **2016**, *17*, 539–548. [[CrossRef](#)]

80. Uysal, B.; Yasar, M.; Ersoz, N.; Coskun, O.; Kilic, A.; Cayc, T.; Kurt, B.; Oter, S.; Korkmaz, A.; Guven, A. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy and medical ozone therapy in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* **2010**, *39*, 9–15. [[CrossRef](#)]
81. Andrzejewska, A.; Dlugosz, J.; Jurkowska, G. The effect of antecedent acute ethanol ingestion on the pancreas ultrastructure in taurocholate pancreatitis in rats. *Exp. Mol. Pathol.* **1998**, *65*, 64–77. [[CrossRef](#)]
82. Pandol, S.J.; Periskic, S.; Gukovsky, I.; Zaninovic, V.; Jung, Y.; Zong, Y.; Solomon, T.E.; Gukovskaya, A.S.; Tsukamoto, H. Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. *Gastroenterology* **1999**, *117*, 706–716. [[CrossRef](#)]
83. Foitzik, T.; Lewandowski, K.B.; Fernández-del Castillo, C.; Rattner, D.W.; Klar, E.; Warshaw, A.L. Exocrine hyperstimulation but not pancreatic duct obstruction increases the susceptibility to alcohol-related pancreatic injury. *Arch. Surg.* **1994**, *129*, 1081–1085. [[CrossRef](#)]
84. Vonlaufen, A. Modeling alcoholic pancreatitis by ethanol feeding and lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base* **2011**. [[CrossRef](#)]
85. Javed, M.A.; Wen, L.; Awais, M.; Latawiec, D.; Huang, W.; Chvanov, M.; Schaller, S.; Bordet, T.; Michaud, M.; Pruss, R. TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester-Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death. *Pancreas* **2018**, *47*, 18–24. [[CrossRef](#)]
86. Schneider, A.; Whitcomb, D.C.; Singer, M.V. Animal models in alcoholic pancreatitis—what can we learn? *Pancreatol.* **2002**, *2*, 189–203. [[CrossRef](#)]
87. Siech, M.; Weber, H.; Letko, G.; Dummler, W.; Schoenberg, M.; Beger, H. Similar morphological and intracellular biochemical changes in alcoholic acute pancreatitis and ischemic acute pancreatitis in rats. *Pancreas* **1997**, *14*, 32–38. [[CrossRef](#)]
88. Hall, B.; Limaye, A.; Kulkarni, A.B. Overview: Generation of gene knockout mice. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2009**, *44*, 19.12.1–19.12.17.
89. Capecchi, M.R. Targeted gene replacement. *Sci. Am.* **1994**, *270*, 52–59. [[CrossRef](#)]
90. Tesson, L.; Cozzi, J.; Menoret, S.; Remy, S.; Usal, C.; Fraichard, A.; Anegon, I. Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res.* **2005**, *14*, 531–546. [[CrossRef](#)]
91. Zan, Y.; Haag, J.D.; Chen, K.-S.; Shepel, L.A.; Wigington, D.; Wang, Y.-R.; Hu, R.; Lopez-Guajardo, C.C.; Brose, H.L.; Porter, K.I. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 645–651. [[CrossRef](#)]
92. Tao, L.; Lin, X.; Tan, S.; Lei, Y.; Liu, H.; Guo, Y.; Zheng, F.; Wu, B.  $\beta$ -Arrestin1 alleviates acute pancreatitis via repression of NF- $\kappa$ Bp65 activation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *34*, 284–292. [[CrossRef](#)]
93. Norkina, O.; Graf, R.; Appenzeller, P.; De Lisle, R.C. Caerulein-induced acute pancreatitis in mice that constitutively overexpress Reg/PAP genes. *BMC Gastroenterol.* **2006**, *6*, 16. [[CrossRef](#)]
94. Jancsó, Z.; Hegyi, E.; Sahin-Tóth, M. Chymotrypsin Reduces the Severity of Secretagogue-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 1017–1021. [[CrossRef](#)]
95. Yu, J.; Ni, L.; Zhang, X.; Zhang, J.; Abdel-Razek, O.; Wang, G. Surfactant Protein D Dampens Lung Injury by Suppressing NLRP3 Inflammasome Activation and NF- $\kappa$ B Signaling in Acute Pancreatitis. *Shock* **2019**, *51*, 557–568. [[CrossRef](#)]
96. Zhao, Q.; Wei, Y.; Pandol, S.J.; Li, L.; Habtezion, A. STING Signaling Promotes Inflammation in Experimental Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 1822–1835.e2. [[CrossRef](#)]
97. Farber, E.; Popper, H. Production of acute pancreatitis with ethionine and its prevention by methionine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1950**, *74*, 838–844. [[CrossRef](#)]
98. Lombardi, B.; Rao, N.K. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Influence of the age and sex of the animals and of dietary ethionine, choline, methionine, and adenine sulfate. *Am. J. Pathol.* **1975**, *81*, 87.
99. Kui, B.; Balla, Z.; Végh, E.T.; Pallagi, P.; Venglovecz, V.; Iványi, B.; Takács, T.; Hegyi, P.; Rakonczay, Z., Jr. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Lab. Invest.* **2014**, *94*, 138–149. [[CrossRef](#)]
100. Gilliland, L.; Steer, M. Effects of ethionine on digestive enzyme synthesis and discharge by mouse pancreas. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **1980**, *239*, G418–G426. [[CrossRef](#)]
101. Akita, S.; Kubota, K.; Kobayashi, A.; Misawa, R.; Shimizu, A.; Nakata, T.; Yokoyama, T.; Takahashi, M.; Miyagawa, S. Role of bone marrow cells in the development of pancreatic fibrosis in a rat model of pancreatitis induced by a choline-deficient/ethionine-supplemented diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *420*, 743–749. [[CrossRef](#)]

102. Nagao, S.; Taguchi, K.; Sakai, H.; Yamasaki, K.; Watanabe, H.; Otagiri, M.; Maruyama, T. Carbon monoxide-bound hemoglobin vesicles ameliorate multiorgan injuries induced by severe acute pancreatitis in mice by their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5611–5620. [[CrossRef](#)]
103. Mizunuma, T.; Kawamura, S.; Kishino, Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J. Nutr.* **1984**, *114*, 467–471. [[CrossRef](#)]
104. Ou, X.; Hua, Y.; Liao, X.; Gong, C.; Kang, Y. Cognitive impairments induced by severe acute pancreatitis are attenuated by berberine treatment in rats. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 3437–3444. [[CrossRef](#)]
105. Tani, S.; Itoh, H.; Okabayashi, Y.; Nakamura, T.; Fujii, M.; Fujisawa, T.; Koide, M.; Otsuki, M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig. Dis. Sci.* **1990**, *35*, 367–374. [[CrossRef](#)]
106. Uçmak, F.; Ekin, N.; İbiloğlu, İ.; Arslan, S.; Kaplan, İ.; Şenates, E. Prophylactic Administration of Silybin Ameliorates L-Arginine-Induced Acute Pancreatitis. *Med Sci. Monit. Int. Med J. Exp. Clin. Res.* **2016**, *22*, 3641–3646. [[CrossRef](#)]
107. Saka, M.; Tuzun, A.; Ates, Y.; Bagci, S.; Karaeren, N.; Dagalp, K. Acute pancreatitis possibly due to arginine use: A case report. *Turk. J. Gastroenterol.* **2004**, *15*, 56–58.
108. Binet, Q.; Dufour, I.; Agneessens, E.; Debongnie, J.-C.; Aouattah, T.; Covas, A.; Coche, J.-C.; De Koninck, X. The second case of a young man with l-arginine-induced acute pancreatitis. *Clin. J. Gastroenterol.* **2018**, *11*, 424–427. [[CrossRef](#)]
109. Seidel, H. Bemerkungen zu meiner Methode der experimentellen Erzeugung der akuten hämorrhagischen Pankreatitis. *Zentralbl Chir* **1910**, *37*, 1601–1604.
110. Dickson, A.; Foulis, A.; Imrie, C. Histology and bacteriology of closed duodenal loop models of experimental acute pancreatitis in the rat. *Digestion* **1986**, *34*, 15–21. [[CrossRef](#)]
111. Adler, G. Experimental models and concepts in acute pancreatitis. *Exocrine Pancreas Biol. Pathobiol. Dis.* **1986**, 407–421.
112. Nevalainen, T.; Seppä, A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* **1975**, *10*, 521–527.
113. Chetty, U.; Gilmour, H.; Taylor, T. Experimental acute pancreatitis in the rat—A new model. *Gut* **1980**, *21*, 115–117. [[CrossRef](#)]
114. Orda, R.; Hadas, N.; Orda, S.; Wiznitzer, T. Experimental acute pancreatitis: Inducement by taurocholate sodium-trypsin injection into a temporarily closed duodenal loop in the rat. *Arch. Surg.* **1980**, *115*, 327–329. [[CrossRef](#)]
115. Deitch, E.A.; Sittig, K.; Li, M.; Berg, R.; Specian, R.D. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am. J. Surg.* **1990**, *159*, 79–84. [[CrossRef](#)]
116. Nieuwenhuijs, V.B.; van Dijk, J.E.; Gooszen, H.G.; Akkermans, L.M. Obstructive jaundice, bacterial translocation and interdigestive small-bowel motility in rats. *Digestion* **2000**, *62*, 255–261. [[CrossRef](#)]
117. Sugimoto, M.; Takada, T.; Yasuda, H. A new experimental pancreatitis by incomplete closed duodenal loop: The influence of pancreatic microcirculation on the development and progression of induced severe pancreatitis in rats. *Pancreas* **2004**, *28*, e112–e119. [[CrossRef](#)]
118. Savu, A.; Savu, B.; Luca, C.; Mihaila, D.; Toma, O.; Crauciuc, E. Experimental models of acute pancreatitis-closed duodenal loop mode. *Analele Stiintifice ale Universitatii" Al. I. Cuza" Din Iasi.* **2009**, *10*, 83–88.
119. Reber, H.A.; Roberts, C.; Way, L.W. The pancreatic duct mucosal barrier. *Am. J. Surg.* **1979**, *137*, 128–134. [[CrossRef](#)]
120. Cen, Y.; Liu, C.; Li, X.; Yan, Z.; Kuang, M.; Su, Y.; Pan, X.; Qin, R.; Liu, X.; Zheng, J. Artesunate ameliorates severe acute pancreatitis (SAP) in rats by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines and Toll-like receptor 4. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *38*, 252–260. [[CrossRef](#)]
121. Aho, H.; Nevalainen, T.; Aho, A. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* **1983**, *15*, 28–36.
122. Unal, E.; Atalay, S.; Tolan, H.K.; Yuksekdog, S.; Yucel, M.; Acar, A.; Basak, F.; Gunes, P.; Bas, G. Biliopancreatic duct injection of ethanol as an experimental model of acute and chronic pancreatitis in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 304–310.

123. Lu, F.; Wang, F.; Chen, Z.; Huang, H. Effect of mesenchymal stem cells on small intestinal injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 12. [\[CrossRef\]](#)
124. Liu, Z.-H.; Peng, J.-S.; Li, C.-J.; Yang, Z.-L.; Xiang, J.; Song, H.; Wu, X.-B.; Chen, J.-R.; Diao, D.-C. A simple taurocholate-induced model of severe acute pancreatitis in rats. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 5732–5739. [\[CrossRef\]](#)
125. Zhu, R.; Zhao, Y.; Li, X.; Bai, T.; Wang, S.; Wang, W.; Sun, Y. Effects of penehyclidine hydrochloride on severe acute pancreatitis-associated acute lung injury in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 1689–1693. [\[CrossRef\]](#)
126. Shi, C.; Hou, C.; Zhu, X.; Huang, D.; Peng, Y.; Tu, M.; Li, Q.; Miao, Y. SRT1720 ameliorates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rats by suppressing NF- $\kappa$ B signalling. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *108*, 50–57. [\[CrossRef\]](#)
127. Huang, L.; Jiang, Y.; Sun, Z.; Gao, Z.; Wang, J.; Zhang, D. Autophagy strengthens intestinal mucosal barrier by attenuating oxidative stress in severe acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 910–919. [\[CrossRef\]](#)
128. Zheng, J.; Xu, H.; Huang, C.; Fan, J.; Mei, Q.; Lu, Y.; Lou, L.; Wang, X.; Zeng, Y. Quercetin protects against intestinal barrier disruption and inflammation in acute necrotizing pancreatitis through TLR4/MyD88/p38 MAPK and ERS inhibition. *Pancreatology* **2018**, *18*, 742–752.
129. Zhang, Y.-M.; Zhu, L.; Zhao, X.-L.; Chen, H.; Kang, H.-X.; Zhao, J.-L.; Wan, M.-H.; Li, J.; Zhu, L.; Tang, W.-F. Optimal timing for the oral administration of Da-Cheng-Qi decoction based on the pharmacokinetic and pharmacodynamic targeting of the pancreas in rats with acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 7098–7109. [\[CrossRef\]](#)
130. Yan, L.; Li, Q.F.; Rong, Y.T.; Chen, Y.H.; Huang, Z.H.; Wang, Z.Z.; Peng, J. The protective effects of rutaecarpine on acute pancreatitis. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 3121–3126. [\[CrossRef\]](#)
131. Zhang, X.-P.; Li, Z.-J.; Zhang, J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. *HepatoBiliary Pancreat. Dis. Int.* **2009**, *8*, 351–357.
132. Pfeffer, R.B.; Lazzarini-Robertson, A.; Safadi, D.; Mixer, G.; Secoy, C.F.; Hinton, J.W. Gradations of pancreatitis, edematous, through hemorrhagic, experimentally produced by controlled injection of microspheres into blood vessels in dogs. *Surgery* **1962**, *51*, 764–769.
133. Lasso, Å.; Ohlsson, K. Consumptive coagulopathy, fibrinolysis and protease antiprotease interactions during acute human pancreatitis. *Thromb. Res.* **1986**, *41*, 167–183. [\[CrossRef\]](#)
134. Liu, L.; Li, Y.; Fan, L.; Zhao, Q.; Wang, D.; Cheng, S.; Zhang, A.; Qin, Y.; Zhang, B. Effect of vascular bradykinin on pancreatic microcirculation and hemorheology in rats with severe acute pancreatitis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2015**, *19*, 2646–2650.
135. Spormann, H.; Sokolowski, A.; Birkigt, H.; Letko, G. Contribution of pancreatic edema and short-term ischemia to experimental acute pancreatitis in the rat. I. Procedure and pathomorphological investigations. *Zeitschrift für Experimentelle Chirurgie Transplantation und Künstliche Organe Organ der Sektion Experimentelle Chirurgie der Gesellschaft für Chirurgie der DDR* **1986**, *19*, 323–330.
136. Sjövall, S.; Holmin, T.; Evander, A.; Stenram, U. Splenic and gastro-duodenal vein occlusion—Influence on the pancreatic gland and on the outcome of experimental pancreatitis. *Int. J. Pancreatol.* **1988**, *3*, 143–149.
137. Hoffmann, T.; Leiderer, R.; Waldner, H.; Arbogast, S.; Messmer, K. Ischemia reperfusion of the pancreas: A new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res. Exp. Med.* **1995**, *195*, 125–144. [\[CrossRef\]](#)
138. Dembinski, A.; Warzecha, Z.; Ceranowicz, P.; Stachura, J.; Tomaszewska, R.; Konturek, S.; Sendur, R.; Dembinski, M.; Pawlik, W. Pancreatic damage and regeneration in the course of ischemia-reperfusion induced pancreatitis in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* **2001**, *52*, 221–235.
139. Bukowczan, J.; Warzecha, Z.; Ceranowicz, P.; Kuśnierz-Cabala, B.; Tomaszewska, R. Obestatin accelerates the recovery in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134380. [\[CrossRef\]](#)
140. Bukowczan, J.; Warzecha, Z.; Ceranowicz, P.; Kusnierz-Cabala, B.; Tomaszewska, R.; Dembinski, A. Therapeutic effect of ghrelin in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 2284–2290. [\[CrossRef\]](#)
141. Schanaider, A.; de Carvalho, T.P.; de Oliveira Coelho, S.; Renteria, J.M.; Eleuthério, E.C.A.; Castelo-Branco, M.T.L.; Madi, K.; Baetas-da-Cruz, W.; de Souza, H.S.P. Ischemia-reperfusion rat model of acute pancreatitis: Protein carbonyl as a putative early biomarker of pancreatic injury. *Clin. Exp. Med.* **2015**, *15*, 311–320. [\[CrossRef\]](#)

142. Churg, A.; Richter, W. Early changes in the exocrine pancreas of the dog and rat after ligation of the pancreatic duct. A light and electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* **1971**, *63*, 521–546.
143. Buchwalow, I.; Schneckeburger, J.; Atiakshin, D.; Samoilo, V.; Wolf, E.; Boecker, W.; Tiemann, K. Oxidative stress and NO generation in the rat pancreatitis induced by pancreatic duct ligation. *Acta Histochem.* **2017**, *119*, 252–256. [[CrossRef](#)]
144. Baxter, J.; Jenkins, S.; Day, D.; Roberts, N.; Cowell, D.; Mackie, C.; Shields, R. Effects of somatostatin and a long-acting somatostatin analogue on the prevention and treatment of experimentally induced acute pancreatitis in the rat. *Br. J. Surg.* **1985**, *72*, 382–385. [[CrossRef](#)]
145. Buscail, L.; S enegas-Balas, F.; Balas, D.; Bouisson, M.; Bertrand, C.; Ribet, A. Protective effect of misoprostol, a synthetic prostaglandin E1 analog, on experimental pancreatitis induced by pancreatic duct ligation in rat. *Pancreas* **1989**, *4*, 715–723. [[CrossRef](#)]
146. Ohshio, G.; Saluja, A.; Steer, M. Effects of short-term pancreatic duct obstruction in rats. *Gastroenterology* **1991**, *100*, 196–202. [[CrossRef](#)]
147. Cohen, D.B.; Magnotti, L.J.; Lu, Q.; Xu, D.Z.; Berezina, T.L.; Zaets, S.B.; Alvarez, C.; Machiedo, G.; Deitch, E.A. Pancreatic duct ligation reduces lung injury following trauma and hemorrhagic shock. *Ann. Surg.* **2004**, *240*, 885–891. [[CrossRef](#)]
148. De-Madaria, E.; Martínez, J.F.; Aparicio, J.R.; Llu s, F. Aggressive Fluid Resuscitation in Acute Pancreatitis: In Aqua Sanitas? *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 1617–1618. [[CrossRef](#)]
149. De-Madaria, E.; Herrera-Marante, I.; González-Camacho, V.; Bonjoch, L.; Quesada-Vázquez, N.; Almenta-Saavedra, I.; Miralles-Maci a, C.; Acevedo-Piedra, N.G.; Roger-Ibáñez, M.; Sánchez-Marin, C. Fluid resuscitation with lactated Ringer’s solution vs normal saline in acute pancreatitis: A triple-blind, randomized, controlled trial. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2018**, *6*, 63–72. [[CrossRef](#)]
150. Singh, V.P. High on drugs: Lessons from opiates in pancreatitis. *Gut* **2018**, *67*, 600–602. [[CrossRef](#)]
151. Zhang, J.; Zhu, S.; Tan, D.; Ma, A.; Yang, Y.; Xu, J. A meta-analysis of early oral refeeding and quickly increased diet for patients with mild acute pancreatitis. *Saudi J. Gastroenterol. Off. J. Saudi Gastroenterol. Assoc.* **2019**, *25*, 14–19.
152. Van Brunschot, S.; van Grinsven, J.; van Santvoort, H.C.; Bakker, O.J.; Besselink, M.G.; Boermeester, M.A.; Bollen, T.L.; Bosscha, K.; Bouwense, S.A.; Bruno, M.J. Endoscopic or surgical step-up approach for infected necrotising pancreatitis: A multicentre randomised trial. *Lancet* **2018**, *391*, 51–58. [[CrossRef](#)]





  2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Artigo II

International Journal of  
Molecular Sciences

Review

## Multifactorial Scores and Biomarkers of Prognosis of Acute Pancreatitis: Applications to Research and Practice

Pedro Silva-Vaz <sup>1,2,3,\*</sup> , Ana Margarida Abrantes <sup>4,5,6</sup>, Miguel Castelo-Branco <sup>1,3</sup>, António Gouveia <sup>2,3</sup>, Maria Filomena Botelho <sup>4,5,6</sup>  and José Guilherme Tralhão <sup>4,5,6,7</sup>

- <sup>1</sup> Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior (CICS-UBI), 6200-506 Covilhã, Portugal; mcbranco@fcsaude.ubi.pt
  - <sup>2</sup> General Surgery Department, Hospital Local de Saúde de Castelo Branco, 6000-085 Castelo Branco, Portugal; agouveia@ulscb.min-saude.pt
  - <sup>3</sup> Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal
  - <sup>4</sup> Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; mabrantes@fmed.uc.pt (A.M.A.); mfbotelho@fmed.uc.pt (M.F.B.); jglrt@hotmail.com (J.G.T.)
  - <sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal
  - <sup>6</sup> Biophysics and Biomathematics Institute, IBILI-Faculty of Medicine of University of Coimbra, 3000-348 Coimbra, Portugal
  - <sup>7</sup> Surgery Department, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), University Hospital, Faculty of Medicine, 3000-075 Coimbra, Portugal
- \* Correspondence: pedro.silvavaz@gmail.com; Tel.: +351-966-498-337

Received: 14 November 2019; Accepted: 2 January 2020; Published: 4 January 2020



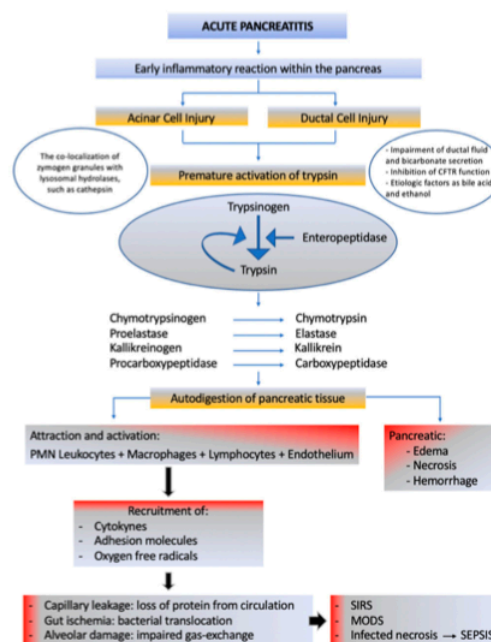
**Abstract:** Acute pancreatitis (AP) is a severe inflammation of the pancreas presented with sudden onset and severe abdominal pain with a high morbidity and mortality rate, if accompanied by severe local and systemic complications. Numerous studies have been published about the pathogenesis of AP; however, the precise mechanism behind this pathology remains unclear. Extensive research conducted over the last decades has demonstrated that the first 24 h after symptom onset are critical for the identification of patients who are at risk of developing complications or death. The identification of these subgroups of patients is crucial in order to start an aggressive approach to prevent mortality. In this sense and to avoid unnecessary overtreatment, thereby reducing the financial implications, the proper identification of mild disease is also important and necessary. A large number of multifactorial scoring systems and biochemical markers are described to predict the severity. Despite recent progress in understanding the pathophysiology of AP, more research is needed to enable a faster and more accurate prediction of severe AP. This review provides an overview of the available multifactorial scoring systems and biochemical markers for predicting severe AP with a special focus on their advantages and limitations.

**Keywords:** acute pancreatitis; severity; prognostic; multifactorial scoring system; biomarker

### 1. Introduction

Acute pancreatitis (AP) is a severe inflammation of the pancreas presented with sudden onset and severe abdominal pain with a high morbidity and mortality rate, if accompanied by severe local and systemic complications. It is the most common gastrointestinal cause of hospitalization [1], associated with high financial burdens [2]. Several studies have shown that the incidence of AP is increasing [3,4], probably as a result of a combination of risk factors, such as obesity and gallstone

disease [5]. The overall mortality rate is 3% to 10%, but patients with the severe form of the disease are at an increased risk of death, with a mortality rate of 36% to 50% [2,6,7]. Although its etiology is complex and not known for certain, the two most common causes are gallstones and alcohol [3,8]. Numerous studies have been published about the pathogenesis of AP; however, the precise mechanism behind this pathology remains unclear [9]. Even with the proposal of several mechanisms about the pathophysiological process of AP, none are totally enlightening [10]. Some of the hypotheses include acinar and ductal premature activation of trypsin, leukocyte attraction and activation, recruitment of cytokines, adhesion molecules, and oxygen free radicals, which lead to mitochondrial dysfunction and microcirculatory injury [9,11–13]. Initial AP events take place in the acinar cells [14]. Acinar cells can act as inflammatory cells as they respond, synthesize, and release cytokines, chemokines, and adhesion molecules [15]. Most research related to the pathophysiology of acute pancreatitis has been directed to acinar cells [16]. However, there is recent evidence that not only the acinar but ductal cell is also involved in the initial events of pancreatic damage and in the development of the inflammatory process [17]. The main function of the pancreatic duct is the bicarbonate and fluid secretion, which can be influenced by alcohol, fatty acids, and bile acids [16,18,19]. The changes in either fluid or bicarbonate secretion are related to changes in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function and expression [17]. It is also important to note that acinar–ductal cell interaction is crucial to the entire process of acute pancreatitis [20]. An excessive inflammatory response is the common aspect of these mechanisms. These can only explain certain aspects of pathogenesis or specific characteristics related to its etiology. The major obstacles in the study of pathogenesis of AP is its rapid course and relative inaccessibility of pancreatic tissue. To overcome this problem, researchers have now taken to animal models to study the molecular aspects of the pathogenesis of AP [2]. Further complicating the issue are the different results obtained from different animals and models exposed to a similar etiology. The premature activation of trypsin is the most consensual theory as the main mechanism in the initiation of the autodigestion of the pancreatic tissue and subsequently on local and systemic inflammatory processes. AP progression is constituted by three phases: Local inflammation, generalized inflammatory response, and multiorgan dysfunction. Figure 1 is an illustration of the schematic overview of AP's pathogenesis.



**Figure 1.** A schematic overview of acute pancreatitis's pathogenesis. The premature activation of trypsin caused by acinar and ductal cell injury. Attraction and activation of leukocyte, macrophages,

lymphocytes, and endothelium causes the release of cytokines, adhesion molecules, and oxygen free radicals. They are responsible for capillary leakage, gut ischemia, and bacterial translocation and alveolar damage. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) is a result of all these events, which may advance to multiorgan dysfunction, as well as infection of pancreatic necrosis and sepsis. CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; PMN: polymorphonuclear; SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome; MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome [6,10,16–23].

Extensive studies conducted over the last decades have demonstrated that the first 24 h after symptom onset are critical for the identification of which patients are at risk of developing complications or death [24,25].

The term biomarker has been defined by the National Institutes of Health as “a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacological responses to a therapeutic intervention” [26]. The principal roles of biomarkers are diagnosis, prognosis, and individualization of therapy. Early assessment of severity in AP becomes crucial, especially on the day of admission, as this period is considered a window of opportunity for defining interventions to prevent pancreatic necrosis and organ failure. Nevertheless, none of the current clinical scoring systems or biochemical markers play a definitive role, have widespread applicable value, or are consistently accurate [24,27,28]. Therefore, early identification of the development of severe AP remains a great challenge.

According to the 2012 revision of the Atlanta classification, AP develops in two phases [6]. In the early phase, which is usually over by the end of the first week, systemic disturbances are secondary to local pancreatic inflammation. As the disease progresses, generalized inflammation occurs, defined as systemic inflammatory response syndrome (SIRS). If SIRS is persistent, there is an increased risk of organ failure and local complications. The definition of the duration of organ failure is important. If it resolves within 48 h, it is called of “transient organ failure”; if it persists for more than 48 h, it is called “persistent organ failure”. When organ failure affects more than one organ it is called multiple organ failure (MOF) or multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [6]. The late phase is characterized by the persistence of systemic signs of inflammation or by local complications. At this stage, the immune system is downregulated, making the (peri) pancreatic tissue more susceptible to infection from intestinal bacterial translocation. The resulting sepsis and multiorgan failure are subsequently the major causes of late morbidity and mortality.

In 65% to 85% of cases, AP is self-limited, not requiring specific treatment other than parenteral intravenous fluid, analgesics, and supportive care [25]. The remaining may suffer from severe attacks, with a high morbidity and mortality. This subgroup of patients need to be identified early in the course of the disease and need to be aggressively treated to prevent mortality [25]. In this sense and in order to avoid unnecessary overtreatment, thereby reducing the financial implications, proper identification of the mild disease is also important and necessary.

Severity assessment in this condition was first started in 1974 by Ranson et al. [29]. Since then other multifactorial scoring systems applying common clinical and biochemical parameters, have been defined to predict the severity. Despite recent progress in understanding the pathophysiology of AP, more research is needed to enable a faster and more accurate prediction of severe AP.

In this review, an overview of the multifactorial scoring systems and biochemical markers for predicting severe AP will be discussed, with a special focus on their advantages and limitations.

## 2. Clinical Assessment

Clinical assessment is an evaluation of a patient’s physical condition and prognosis based on information gathered from their physical condition and the patient’s medical history. The differentiation between mild and severe AP based on clinical assessment has been evaluated in several studies [30–32]. Wilson et al. [30] evaluated each patient on admission, at 24 and 48 h after admission, and classified



AP as mild, moderate, and severe based on the presence or absence of shock and respiratory distress; the adequacy of the peripheral perfusion and urine output; fever; body wall staining; and the degree of abdominal tenderness, distension, and ileus. They verified that the sensibility, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy were, on admission, 34%, 98%, 87%, 83%, and 83%, respectively, and at 24 and 48 h after admission, 47%, 100%, 100%, 86%, and 87%, respectively, in both. They concluded that on admission, the clinical assessment was much less sensitive. Previous studies suggested that at 48 h after admission, clinical assessment was a good tool for predicting the severity of AP [32]. Pagliari et al. [33] in a recent review, highlighted the importance of clinical evaluation not only in diagnosis but also in clinical course.

### 3. Multifactorial Scoring Systems

#### 3.1. Ranson Score

The Ranson score was published in 1974 as the first specific multifactorial scoring system for AP [34]. It was primarily designed for patients with acute alcoholic pancreatitis, consisting of 11 parameters identified as significant prognostic factors: Five parameters measured at admission and six during the next 48 h. Ranson et al. [35] in 1979 modified the original score, adapting it for patients with acute biliary pancreatitis. Mortality increases with an increasing score. A score between 1 to 3 criteria represents mild AP; the mortality rate rises significantly with four or more criteria, being 100% in those with six or more [34]. Hagjer et al. [36] evaluated the Ranson score as a predictive tool for AP severity, organ failure, necrosis, and mortality, describing an area under the receiver-operating curve (AUC) of 0.810, 0.839, 0.556, and 0.803, respectively. The disadvantages of the Ranson score is that it requires 48 h to be completed, uses parameters that are not usually evaluated in clinical practice, and is missing a potentially valuable early therapeutic window.

#### 3.2. Glasgow Score

Imrie et al. [37] proposed a modification of the Ranson scoring system, where they excluded hematocrit, base deficit, and fluid sequestration, and added albumin and changed the cut-off points. This score was later simplified [38,39]. The Glasgow score is a good prognostic tool for mortality, regardless of the etiology [30]. Buxbaum et al. [40] showed an AUC for the Glasgow score to predict an AP severity of 0.73. In turn, Kiat et al. [41] verified an AUC for a severity of 0.784. The main disadvantage of this score is similar to Ranson's score, requiring 48 h for a final calculation punctuation.

#### 3.3. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score

The APACHE score was originally designed to assess the severity of patients with acute illness admitted to intensive care units (ICUs) in the 1970s. In the 1980s, Wagner et al. [42] described a simplification of the APACHE score, since it was the most widely used scoring system for severity assessment, designating it as APACHE-II. The APACHE-II has been used as a reference standard in several studies to evaluate new prognostic scoring systems or to identify individual risk factors for severe outcomes [42]. This score, although widely used in different types of studies is not specific to AP. Wu et al. [43] verified that only 2.2% of included patients with AP had complete data for the APACHE-II classification. Despite this complexity, the APACHE-II score requires 14 parameters. Using the worst data during the initial 24 h after admission, several studies have shown a correlation between a higher APACHE-II score at admission to into the first 72 h, with a higher mortality rate (<4% with an APACHE-II score <8 and 11% to 18% with an APACHE-II score ≥8) [44–46]. When the severity of AP is assessed, this score is powerless in distinguishing between interstitial and necrotizing AP, which is associated with a different prognosis [47]. Chatzicostas et al. [48] verified that the APACHE-II score generated within the first 24 h had a PPV of only 43% and NPV of 86% for severe AP. It can be used to assess the severity of the patient on a day-to-day basis. Papachristou et al. [49], recognizing obesity as a risk factor for complications of AP, proposed APACHE-O, an improvement on the APACHE-II

accuracy. However, they concluded that APACHE-O did not improve the accuracy of APACHE-II (AUC 0.895 for APACHE-O and 0.893 for APACHE-II). Harshit et al. [50] compared APACHE-II with other scores in predicting the severity of AP and concluded that this score was an effective prognostic scoring system able to predict the severity of AP. The disadvantage of APACHE-II is the need for 24 h for the final determination of AP severity and it is complex and difficult to use in clinical practice.

#### 3.4. Bedside Index of Severity in Acute Pancreatitis Score

The Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis (BISAP) was developed in 2008 by Wu et al. [43]. They described it as an easy score that is calculated from data available in the first 24 h after admission [51]. This feature is extremely significant given that the first 24 to 48 h are the most crucial and decisive time window in the management of AP. The performance of the BISAP score in predicting severe AP has been corroborated by numerous studies [43–45,52–54]. The BISAP score was aimed for use during the first 24 h of admission to hospital and includes five parameters [43,55]. This score was derived using data from a population of 17,992 patients and validated on a population of 18,256 patients in the USA and could predict in-hospital mortality from AP with an AUC of 0.83 (95% CI:0.8–0.85) [56]. The BISAP score registered an identical efficiency for predicting outcomes as the APACHE-II, but it was easier to determine than the APACHE-II score [53,57]. Khanna et al. [58] showed a sensitivity, specificity, PPV, and NVP for severity of AP of 74.2%, 68.3%, 63.4%, and 77.8%, respectively. In their turn, Hagjer et al. [36] for severity, organ failure, and death associated with AP found an AUC to BISAP score of 0.875, 0.906, and 0.740, respectively. They concluded that BISAP predicts severity, organ failure, and death in AP very well. It is as good as APACHE-II but better than the Ranson criteria, contrast tomography severity index (CTSI), c-reactive protein (CRP), hematocrit, and body mass index (BMI). Although easy to perform, its utility in a clinical setting does not appear appealing.

#### 3.5. Systemic Inflammatory Response Syndrome

The SIRS score is simple and widely used in the clinical setting. According to Banks et al. [6], during the early phase of AP, local pancreatic injury will provoke systemic disturbances. It is in this phase that cytokine cascades are activated by this local inflammation, which clinically manifest as SIRS. If SIRS ( $\geq 2$ ) persists for more than 48 h after admission, there is an increased risk of developing multiorgan dysfunction, determined by the modified Marshall scoring (MMS) system [6]. Although several studies have shown that the SIRS score can predict the severity of AP [59,60], Li et al. [61] showed that SIRS had a medium performance with the lowest AUC when compared with the APACHE-II, Ranson score, BISAP, sequential organ failure assessment (SOFA), and MMS, in predicting severe AP, pancreatic necrosis, and infected pancreatic necrosis (IPN). They concluded that the SIRS score is not a priority in predicting severe AP, pancreatic necrosis, and IPN.

#### 3.6. Pancreatitis Activity Scoring System

An international panel of experts developed the acute Pancreatitis Activity Score System (PASS) to measure the disease activity in patients with AP [62]. In this score, five parameters were included: Organ failure, SIRS, abdominal pain, requirement for opiates, and ability to tolerate oral intake. Buxbaum et al. [40] studied the correlation between the PASS score and the severity of AP, finding an AUC of 0.71. They concluded that the PASS score performance was compared to established systems used to predict severe AP. Ke et al. [63] showed that the admission PASS score was strongly associated with IPN, with an AUC of 0.813, which is was to the APACHE-II score of 0.791, BUN of 0.740, and CRP of 0.619.

## 4. Imaging Scoring Systems and Techniques

### 4.1. Contrast-Enhanced Computed Tomography

Due to its availability and imaging characteristics, contrast-enhanced computed tomography (CECT) is an imaging modality widely used for the diagnosis, assessment of severity, and morphological classification of AP [25]. It is well known that CECT imaging helps in the delineation of pancreatic and/or peripancreatic necrosis, inflammatory changes, and the characterization of the morphology of fluid collections, making it an excellent tool for the therapeutic decision and approach and monitoring of treatment response [64]. Despite all these features, the majority of the patients do not require computed tomography (CT) for the diagnosis of AP, and the CECT is not indicated in patients who are clinically stable and with clinical improvement [6,25]. CECT also fails to predict the formation of necrosis when performed very early after the beginning of symptoms. The ideal time for performing this imaging technique is at least after 72 h after onset [57,64]. The sensitivity and specificity of perfusion CT for predicting necrotizing pancreatitis was given as 87.5% and 100%, respectively [65]. These data suggest that perfusion CT might be an alternative measure to the clinical scores and CECT for risk stratification in severe AP. The severity of AP was assessed using several CT scoring systems. The first score was described by Balthazar et al. [66]. By using early CT signs of AP, they were able to develop a gradient system to predict the severity based on the overall evaluation of the size, contour, and density of (peri)pancreatic abnormalities. In 1990, Balthazar et al. [67] validated the CTSI by combining their original score system with the presence and extension of pancreatic necrosis. Although having better prognostic accuracy than the original score, several limitations were described associated with CTSI, which led to the proposal by Mortelé et al. [68] of a new score, the modified CT scoring system (mCTSI). This score proved to have better accuracy for infection, organ failure, the need for surgical or percutaneous intervention, the length of hospital stays, and death. Raghuwanshi et al. [69] verified that mCTSI was more accurate, easier to calculate, and reduced inter-observer variation compared to CTSI. Avanesov et al. [70] concluded that mCTSI was more accurate in predicting short-term mortality and CTSI for predicting the need of intervention. Despite all the improvements to the first score, CT scanning did not predict the severity of AP better than conventional systems and it is not recommended on admission purely for severity assessment [71,72].

### 4.2. Transabdominal Ultrasonography

Conventional transabdominal ultrasound (US) plays only a limited role in the staging of AP, since the detection of pancreatic necrosis is difficult because this exam cannot assess organ perfusion [73]. Through the use of contrast enhancers, it can provide characterization of pancreatic vascularization behavior and can differentiate between areas of inflammation (hypervascularized) and areas of necrosis (hypovascularized or non-vascularized) [74,75]. Golea et al. [74] concluded that contrast-enhanced ultrasound (CEUS) is usefulness in the quantification of the necrosis area in AP. Cai et al. [76] conducted a study to evaluate the accuracy of conventional US and CEUS in patients with AP, concluding that CEUS is a reliable method for the diagnosis and prognosis of AP, and it may serve as a substitute for CECT. Skouras et al. [77], by studying the characteristics of lung ultrasonography and its role in the diagnosis of respiratory dysfunction, proposed that this exam may be an adjuvant in the assessment of the severity of pancreatitis.

### 4.3. Endoscopic Ultrasonography

Endoscopic ultrasonography (EUS) allows for the visualization of the whole pancreas with details of the parenchymal structure and peripancreatic changes due to its high resolution images [78,79]. EUS can also determine the etiology of idiopathic AP [80], the presence of microlithiasis, occult pancreatic malignancies, morphologic changes as pancreas divisium, and evaluate chronic pancreatitis. The close proximity of the endoscopic ultrasound probe to the pancreas results in high spatial resolution that is superior to that of CT and magnetic resonance imaging (MRI) [78]. Sotoudehmanesh et al. [78]

concluded that peripancreatic edema in EUS may be a new imaging criterion for the early prediction of the severity of AP (sensitivity, specificity, and accuracy: 65.8%, 75.5%, and 72.2%, respectively). They verified that the cutoff day for the detection of severe AP is the second day of admission, which is very important for the decision of therapeutic modality. Khanna et al. [58] studied the presence of pancreatic and extrapancreatic necrosis and concluded that patients with acute necrotizing pancreatitis have multiple hypoechoic or hyperechoic areas in the pancreas that were not present in patients with mild AP.

## 5. Metabolic Factors

### 5.1. Metabolic Syndrome

Metabolic syndrome includes hyperglycemia, dyslipidemia, hypertension, and obesity [81]. There has been an increase in its incidence due to lifestyle habits [82]. Few studies related metabolic syndrome with acute pancreatitis and their results are varied. However, a high prevalence of metabolic syndrome has been found in patients with AP and some studies associate this syndrome to severe forms of AP [82–84]. Mikolasevic et al. [82] showed that patients with metabolic syndrome had a significantly higher incidence of moderately severe and severe AP in comparison to those without metabolic syndrome. They found that the number of metabolic syndrome components is in relation to the severity of AP. The authors also verified that patients with metabolic syndrome presented with more local and systemic complications.

#### 5.1.1. Increased Body Mass Index

Lankisch et al. [85] studied the role of obesity as a negative prognostic factor of AP. They concluded that increased body weight was associated with increased incidence of early extrapancreatic complications. Several studies have been done between obesity and AP, and they have considered obesity as an independent risk factor for severe AP [86]. Krishna et al. [87] concluded, in their study, that morbid obesity is a negative factor for inpatient hospitalization and it is associated with the mortality, organ failure, and high costs. Dobszain et al. [88], in a meta-analysis, demonstrated that a BMI > 25 increases the risk of severe AP, but not mortality, while a BMI > 30 raises the risk of both severity and mortality of AP. Obesity is a known risk factor for gallstone generation, associated with a high risk for gallstone-related complications and AP complications [89]. Martinez et al. [90] showed a significantly higher rate of severe AP, with an OR of 2.9 (95%CI 1.8–4.6) systemic 2.3 (95% CI 1.4–3.8) and local complications 3.9 (95% CI 2.4–6.6) in obese compared to non-obese patients with AP. Obesity is also related to a poor prognosis of AP, due to the relative increase in the proportion of intrapancreatic fat and the release of high levels of circulating proinflammatory cytokines and adipokines [49,91].

#### 5.1.2. Hyperlipidemia

Hyperlipidemia is the third most common cause of AP [81,92]. Few studies have investigated the relationship between hypertriglyceridemia and the severity of biliary pancreatitis. Valdivielso et al. [92] found that the presence of hypertriglyceridemia was related with severe AP. Zeng et al. [93] verified that hypertriglyceridemia was associated with local and systemic complications. Szentesi et al. [84] verified that hypertriglyceridemia elevated the risk of severe AP.

#### 5.1.3. Hypertension

There are very few studies addressing the relationship between hypertension and AP severity. Szentesi et al. [84] showed that hypertension was independently associated with the severity of AP by increasing the risk of renal failure and prolonged hospitalization, although the underlying mechanism is not known.

### 5.2. Fatty Liver

Fatty liver is commonly associated with pancreaticobiliary diseases, including acute pancreatitis [94]. The incidence of fatty liver as a metabolic condition is increasing considerably. There have been several studies on the association between fatty liver and AP, namely with the severity of AP [81]. Yoon et al. [95], in their study investigating the relationship between fatty liver and the severity of AP, verified that fatty liver may play a prognostic role in this disease and could be incorporated into future predictive scoring models.

### 5.3. Diabetes Mellitus

Some studies have investigated the presence of diabetes mellitus and the severity of AP [81]. However, the results of these studies are contradictory, as some relate the presence of DM to the severity and mortality of PA patients [96,97] while others report that there are no differences between severity and mortality in patients with and without DM [84,98,99].

## 6. Genetic Predisposition

The major challenge of AP is to assess the course of the disease and identify which patients develop mild AP and which patients may have severe AP. This variation in outcome may be related to the genetic polymorphic propensity to produce proinflammatory cytokines [100]. D'Oliveira Martins et al. [101] conducted a study to evaluate the potential modulating role of 15 gene polymorphisms in 10 genes involved in oxidative stress and the apoptotic pathway. This study provided an insight into the potential role of genes polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, LTA, TNFRSF1B, and TP53 gene variants and AP susceptibility.

## 7. Molecular and Serum Markers

### 7.1. Tumor Necrosis Factor-Alpha

Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  is an important inflammatory cytokine that participates in the pathogenesis of AP, directly injuring acinar cells and resulting in necrosis, inflammation, and edema [22]. This cytokine, thought to be the first cytokine released, is the main mediator of immune responses [102]. TNF- $\alpha$  expression in the pancreas is increased by the onset of experimental AP. El-Ashmawy et al. [103] conducted a study with a murine model of L-arginine-induced pancreatitis to study the underlying molecular mechanisms of AP. They verified that the pancreatic TNF- $\alpha$  concentration was markedly elevated following L-arginine administration. This may be attributed to the excessive generation of reactive oxygen species (ROS), which activates the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), with subsequent upregulation of various inflammatory cytokines, particularly interleukin (IL)-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Levels of TNF- $\alpha$  receptors, indicators of TNF- $\alpha$  activity, have been found to be increased in patients with severe AP, and TNF- $\alpha$  blockade has been shown to reduce mortality and ameliorate the severity in experimental AP [102]. Despite all the knowledge about this cytokine, the results among different studies, regarding its role in predicting the severity in pancreatitis, are conflicting [104]. Paajanen et al. [105] verified that the serum TNF- $\alpha$  levels showed no significant differences between the patients who developed complications and those who did not. Exley et al. [104] concluded that serum TNF- $\alpha$  at presentation, for a cut-off of 35 ng/L, correlated with a worse prognostic score and a severe outcome in all patients ( $r = 0.36$ ,  $p = 0.027$ ;  $r = 0.33$ ,  $p < 0.05$ ) and prognostic score, outcome, and mortality in patients with gallstones ( $r = 0.58$ ,  $p = 0.005$ ;  $r = 0.60$ ,  $p = 0.005$ ,  $r = 0.50$ ,  $p = 0.02$ ).

### 7.2. Interleukin-1

IL-1 is well known as an integral early component of the acute inflammatory process [106]. Heresbach et al. [107], in their study to evaluate the severity of AP, found that levels of IL-1 predict severe AP on admission with a similar accuracy to IL-6 (82% versus 88%, respectively) and that IL-1

receptor antagonist had the best accuracy among different markers, including IL-6 and CRP, within the first 48 h. At 48 to 72 h, IL-1 levels have been found to be predictive of pancreatic necrosis with an accuracy of 88%, and the IL-1:IL-1 receptor antagonist ratio could identify septic complications with an accuracy of 72%. Chen et al. [108] evaluated IL-1 $\beta$  on admission and described an accuracy of 82% for a cut-off of  $\geq 1$  pg/mL.

### 7.3. Interleukin-6

IL-6 is the principal stimulus for acute-phase protein synthesis in the liver and constitutes the main mediator in the synthesis of fibrinogen, CRP, and hepcidin. The role of IL-6 in the early and accurate prediction of severity in AP was confirmed by numerous studies [21,58,109,110]. Soyalp et al. [111] found that a raised IL-6 level increased in accordance with the severity of pancreatitis, suggesting that IL-6 could act as a prognostic tool of AP. IL-6 has the best sensitivity and specificity for the early assessment of severe AP among the various proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. Jiang et al. [112] found a sensitivity and specificity of 100% and 89.7%, respectively, for a cut-off value of 50 pg/mL. Khanna et al. [58] described, for a similar cut-off, a sensitivity of 93.1% and specificity of 96.8%. IL-6 assay has, however, a major drawback, in that its serum concentration decreases very rapidly, as well as its cost and complexity.

### 7.4. Interleukin-8

Among all the cytokines, IL-8 stands out in the AP pathophysiology as it has been demonstrated to be significantly elevated during the development of AP, and the level was reported to be associated with the severity of AP [113]. Several studies have shown promising results in the early prediction of severe AP [114]. Rau et al. [115] verified the role of IL-8 in monitoring major complications in patients of necrotizing pancreatitis with multiorgan failure. Various studies verified that IL-8 levels are increased in the first 24 h after symptom onset, with a rapid decrease after 3 to 5 days being a good marker of multiorgan failure and death from sepsis in patients with AP [116].

### 7.5. C-Reactive Protein

CRP is a positive acute-phase reactant synthesized by the liver, induced by cytokines like IL-6, and its level in the blood increases within hours in response to inflammation and infection [117]. It can be used for diagnosis, prognosis, treatment follow-up, and mortality prediction, especially in inflammatory cases [118]. It takes the CRP level nearly 72 h to peak after the onset of symptoms [58,119]. Mayer et al. [120] performed the first study on the role of CRP in the prediction of the outcome of AP. They concluded that increased levels of CRP may predict the severity of AP. Vasudevan et al. [53] evaluated the early risk assessment of AP by comparing various scores and biochemical markers. Regarding RCP, they found that to predict the severity of AP for a cut-off of  $\geq 82$  ng/mL, the odds ratio (OR) was 6.7 (95% CI 1.95–23,  $p = 0.002$ ), and to predict the infected pancreatic necrosis for a cut-off of  $\geq 98$  ng/mL, the OR was 2.0 (95% CI 1.06–3.73,  $p = 0.03$ ). They also calculated a predictive value of CRP, with an AUC of 0.8218 for severe AP. It is currently accepted that levels of CRP above 150 mg/dL at 48 h after admission help discriminate severe from mild disease [58], having a sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 80%, 75%, 67%, and 86%, respectively, for severe AP [121]. CRP rises steadily in relation to the severity of AP and it is commonly used because it is inexpensive and readily available [117,122,123]. Miko et al. [124] evaluated the severity and mortality related with AP by comparing several score systems and biochemical markers, including CRP. They verified that CRP presented an AUC to the severity of AP of 0.73, with a sensibility and specificity of 71% and 87%, respectively. Farkas et al. [125] developed a multicenter study to assess the role of CRP as a tool to include patients in clinical trials, concluding that although admission has a poor association with mortality and severity of BP, it can be used as an inclusion criterion of patients in clinical trials. CRP is the most promising biochemical marker, with many studies showing a correlation of its high levels with pancreatic necrosis development and a severe AP course [126]. However, CRP

levels are influenced by liver disease [127], which may be present in many patients with AP who are obese and/or alcoholics. Despite its high applicability in clinical practice, this inflammatory marker has disadvantages, such as its late peak (48 to 72 h), its nonspecificity as an inflammatory marker of the pancreas, and its levels are not associated with the infection [128]. Due to their non-specificity, other inflammatory conditions may influence its increase.

#### 7.6. Procalcitonin

Procalcitonin (PCT) is a propeptide synthesized by hepatocytes and G-cells of the thyroid gland [58]. It is an acute-phase reactant and several studies have validated its role as an early biochemical marker in infection, sepsis, and multiorgan failure [129]. Severe AP is known to be associated with sepsis, infected pancreatic necrosis, and multiorgan failure, and PCT can be used as an early tool in the prognosis of AP [130,131]. For a faster result, PCT levels can be measured by a semiquantitative strip test with a cut-off level of 0.5 ng/mL [132] while other studies report a better cut-off of 2 ng/mL [133]. An increased PCT level in patients with AP was found to be indicative of severity, pancreatic necrosis, and organ failure. A systematic review found that the sensitivity and specificity of PCT for the development of severe AP were 72% and 86%, respectively, and that the overall AUC was 0.87, for a cut-off value of 0.5 ng/mL [134]. In their study, Khanna et al. [58] found a 100% sensitivity of PCT for predicting organ failure and mortality, and a sensitivity of 86.4% for predicting severe AP. Hagjer et al. [36], in their prospective observational study, concluded that PCT was a promising inflammatory marker with prediction rates similar to the BISAP score. Studies showed that PCT is the most sensitive laboratory test for the detection of pancreatic infection, and low levels appear to be strong negative predictors of infected necrosis [128]. The role of this marker as a tool to identify which patients need antibiotics as well as the duration of the treatment is under study [135]. The major disadvantage of PCT assay is its high cost.

#### 7.7. Polymorphonuclear Elastase

PMN elastase is one of the serine proteases found in the granules of neutrophils [136]. Granulocyte infiltration and activation, which occurs as a first-line defense following tissue injury, leads to the release of multiple microbicidal products, including reactive oxygen species, cationic peptides, eicosanoids, and proteolytic enzymes [109,136]. This process also occurs in the early phase of AP [137]. With a cut-off level of 110 µg/L, Dominguez-Muñoz et al. [137] found a sensitivity and specificity of 92% and 91%, respectively, for the detection of severe AP within 48 h of the onset of symptoms. A similar result has been found in several studies [114,117,138].

#### 7.8. Tissue Factor

Tissue factor (TF) is a transmembrane glycoprotein involved in the initiation of the coagulation cascade. It is expressed in the vascular adventitia but may also be expressed from leukocytes, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and platelets [139]. Recent studies have shown the efficiency of TF as a marker to assess the severity. Andersson et al. [140] found that TF was superior to CRP for predicting severity. Ou et al. [141] concluded that TF expression and the associated dysfunction of the blood coagulation system are critical factors for the pathogenesis of severe AP. A high serum level early in the course may suggest a role in the pathogenesis of AP and provide a window for therapeutic interventions.

#### 7.9. Hepcidin

Hepcidin is a circulating peptide hormone that regulates the entry of iron into plasma. The hepcidin levels increase during inflammation as a result of an increase of IL-6 [142]. Studies have shown that hepcidin is synthesized in the liver, kidney, heart, brain, muscles of the skeleton, and pancreas [143]. Based on this theory, Arabul et al. [144] undertook a single center prospective study to

assess its role in predicting the severity in AP. They found that hepcidin is a better predictive marker for severe AP compared to CRP with an AUC of 0.82 versus 0.69, respectively.

#### 7.10. Copeptin

Copeptin is a 39 amino acid glycopeptide that is co-synthesized with vasopressin [145]. Its level rises during stress in critically ill patients, making it an independent predictor of survival in this group of patients. Isman et al. [146] verified a significantly high concentration of copeptin on admission in patients with severe AP. They also identified copeptin as a novel prognostic marker to predict local complication, organ failure, and mortality in AP. Nebiker et al. [147] compared copeptin with others markers, including CRP, and concluded that copeptin was associated with disease severity to a similar degree as CRP.

#### 7.11. Soluble E-Selectin and Soluble Thrombomodulin

Soluble E-selectin (sES) is an endothelial activation marker, whereas soluble thrombomodulin (sTM) is an endothelial injury marker. During AP, activated neutrophils release elastase, which damages the endothelium. Ida et al. [148] studied these two markers to find their significance in the assessment of severe AP. They concluded that those high levels of soluble ES can be found in all stages of the disease. Soluble ES and TM can be used as a predictive marker of mortality in AP on the first day of admission.

#### 7.12. Endothelin I

Elevated levels of endothelin I (ET-1) have been found to be associated with AP, with a strong correlation with disease severity. Milnerowicz et al. [149] measured plasma ET-1 levels, verifying that ET-1 can be used as a marker of both the progression of the disease and monitoring treatment [150]. They also concluded that an increase in levels of ET-1 between the fifth and seventh days of treatment may indicate irreversible ischemia lesions in the pancreas and the development of pancreatic necrosis.

#### 7.13. Matrix Metalloproteinase-9

Matrix metalloproteinase (MMP) are a group of enzymes involved in processes, such as inflammation, degradation, and turnover of the extracellular matrix, as well as angiogenesis and tumor growth [151]. The role of MMP-9 has been extensively studied in AP and increased levels of MMP-9 have been found to be of possible prognostic significance [152]. Guo et al. [153] verified a strong association between high levels of MMP-9 and pancreatic necrosis. It can also be used as a marker of disease severity and assessment of the course of the disease [154].

#### 7.14. Albumin

Albumin is a negative acute-phase protein synthesized by the liver and its level in the blood decreases during inflammation. Albumin was shown, in previous studies, to be associated with inflammation severity, disease prognosis, and mortality, due to the relationship between inflammation and malnutrition [155]. A few studies have evaluated hypoalbuminemia as a predictor of severe acute pancreatitis [156,157]. Hong et al. [158] concluded that hypoalbuminemia within 24 h of hospital admission is independently associated with increased risk of the development of persistent organ failure and death in AP.

#### 7.15. Total Calcium

Low serum ionized calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) levels have been demonstrated as playing an important role in detecting patients with severe AP [159]. Gutiérrez- Jiménez et al. [160] verified a sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 67%, 82%, 27%, and 96% at a maximum



cut-off of 7.5 mg/dL for total calcium in predicting severe AP. Yu et al. [161] showed that low serum  $\text{Ca}^{2+}$  is an independent risk factor affecting the severity of AP.

#### 7.16. Pancreatic Protease Activation Peptides

Trypsinogen activation peptide (TAP) is a cleavage product of trypsinogen, which is released into systemic circulation with zymogen granule activation. Because of its low molecular weight, TAP is rapidly excreted in urine and is easily detected in both urine and serum. Similarly, carboxypeptidase B activation peptide (CAPAP) is a peptide fragment of procarboxypeptidase B, a large cytosolic protein in acinar cells [162]. Wu et al. [163] developed a study to assess the role of trypsinogen-2 in predicting local pancreatic complications. They concluded that urinary trypsinogen-2 level  $>500 \mu\text{g/L}$  independently predicted local complications of AP. On the other hand, Yasuda et al. [164] studied the role of urinary trypsinogen-2 and TAP to assess extra-pancreatic complications. They confirmed that the urinary trypsinogen-2 dipstick test was useful as a marker for the diagnosis of AP. The authors also verified that both trypsinogen-2 and TAP may be useful markers to determine extra-pancreatic inflammation in AP. Deng et al. [165], in their systematic review and meta-analysis, verified that both serum and urinary CAPAP have the potential to act as a stratification marker on admission in predicting the severity of AP.

#### 7.17. Red Blood Cell Distribution Width

Red blood distribution width (RDW) is a routine parameter of the complete blood count test, which is easily obtained and inexpensive [166,167]. It is commonly performed in the assessment of almost all patients at the time of admission. Conventionally, RDW has been used as a tool to explore the etiologies of anemia. During the past decade, RDW has been associated with inflammatory parameters, such as CRP, IL-6, and fibrinogen [167]. It has also been associated disease activity and the prognosis of various diseases, such as malignancies, heart failure, autoimmune diseases, and hepatocellular carcinoma [166]. To date, multiple studies have examined the usefulness of RDW in determining the prognosis of AP at the time of admission, but the results have not been consistent [166]. Zhou et al. [168] studied the predicting value of several markers, including RDW. They concluded that RDW is a convenient and reliable indicator for the prediction of not only severe AP but also mortality.

#### 7.18. Blood Urea Nitrogen

Several prognostic scoring systems, including the Ranson score, incorporate blood urea nitrogen for predicting the severity and mortality of AP [43,169]. This marker provides information on changes in intravascular volume status. Therefore, it could be used in monitoring early responses to initial fluid resuscitation [170]. Wu et al. verified, in a large prospective multicentric study, that blood urea nitrogen (BUN) was an accurate predictor of mortality for a cut-off of  $\text{BUN} \geq 20 \text{ mg/dL}$  on admission, where the associated OR was 4.6 for mortality [56]. They also concluded that a rise in the levels of BUN within the first two days has been correlated with increased mortality.

#### 7.19. Hematocrit

Hemoconcentration may be a marker that translates pancreatic microcirculation insufficiency responsible for the development of necrosis [171]. Hemoconcentration on admission, as defined by initial hematocrit, has been described as a useful tool of prognosis of AP. Early hemoconcentration has been shown to be associated with an increased risk of both necrosis and severe AP [172]. Elevated levels of hematocrit on admission (hematocrit  $>44\%$ ) have been associated with the development of pancreatic necrosis, organ failure, as well as prolonged hospitalization and need for intensive care [173–175].

#### 7.20. Creatinine

Renal involvement has frequently been reported in the course of AP [176]. Muddana et al. [177], in their study for a cut-off of creatinine >1.8 mg/dL within 48 h after hospital admission, showed an OR of 34.5 (CI 95% 7.3 to 169) for the development of pancreatic necrosis when compared with admission hematocrit and BUN levels. They concluded that an increase in creatinine concentration within 48 h of admission is strongly associated with the development of pancreatic necrosis.

#### 7.21. Proteinuria

Increased renal permeability is verified after burn injury, trauma, ischemia, and surgery conditioning low proteinuria [178]. The degree of proteinuria correlates with severity and outcome in a variety of pathologies [178,179]. This marker can be detected by a urine dipstick that allows for easy and inexpensive results. Shearmen et al. evaluated the levels of urine excretion of albumin and IgG in patients with AP. They verified that during the first 36 h, levels were significantly higher in patients with severe AP, concluding that low proteinuria may be reflected the severity of inflammation in AP. However, Zuidema et al. [179], in their study that compared the relation between proteinuria and severity of AP, infection complications, need for invasive approach, intensive care stay, and in-hospital mortality, concluded that proteinuria was inferior to the CRP. Despite the differences verified between the two studies, future research with a larger sample population may contribute to an evaluation of the role of proteinuria as a prognostic marker of pancreatitis.

#### 7.22. Angiopoietin 2

Angiopoietins are a novel class of angiogenic growth factors that act selectively on endothelial cells [180]. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are modulators of vascular permeability. Angiopoietin-2 has been recently evaluated as a marker of persistent organ failure in patients with severe AP, since it is an endothelium-specific growth factor regulated by proinflammatory stimuli. This results in destabilization of the vascular endothelium and an increase of vascular leakage [180]. Whitcomb et al. [181], in a multicenter prospective study, assessed the role of angiopoietin-2 as an early marker of persistent organ failure in patients of severe AP. They found that angiopoietin-2 levels on the day of admission were significantly higher in patients with persistent organ failure, with a sensitivity, specificity, and area under the curve of 90%, 67%, and 0.81, respectively.

#### 7.23. Oleic Acid Chlorohydrin

From studies of the pathophysiology of AP in murine models, it was found that infiltration and activation of pancreatic polymorphonuclear neutrophils and in the surrounding areas of adipose tissue results in the generation of hypochlorous acid and fatty acid chlorohydrins (FA-CI), with oleic acid chlorohydrin (OAC) being the most abundant. Franco-Pons et al. [182] evaluated the generation of halogenated fatty acids in the areas of fat necrosis in rats and they concluded that during AP, adipose tissue release FA-CI, which exacerbated the SIRS. Based on these results, de-Madaria et al. [183] evaluated the role of OAC in a prospective and multicenter cohort study as marker of the severity of AP. They concluded that OAC is generated during AP, its levels can be measured in plasma, and these correlate with AP severity.

#### 7.24. D-Dimer

The activation of the coagulation cascade has been known to occur during the early phase of AP, and AP induces the formation of venous thrombosis [184]. Thrombosis is a vascular event associated with AP complications that cause morbidity and mortality [185]. D-dimer can be used as a potential severity marker in AP. Significantly different levels of D-dimer have been identified in patients with mild or severe AP. Radenkovic et al. [186] verified D-dimer as a novel marker for predicting organ

failure, with a sensitivity of 90% and NPV of 96% for a cut-off level of 414.00 microg/L. Several studies show that D-dimer is an easy, useful, and inexpensive early prognostic marker of severe AP [186,187].

#### 7.25. Histones

Histones have been examined in experimental AP murine models, and most have shown a correlation between circulating levels and AP severity [188,189]. Histones are essential for DNA packaging and genetic regulation. In cases of severe sepsis, such as severe AP, circulating histones are detectable in the blood [190]. Kang et al. [191] suggested that circulating histones behave as damage-associated molecular pattern molecules that cause inflammation and contribute to SIRS and death. Histones stimulate cytokine release. Ou et al. [188] in AP murine models found that circulating histones increased significantly in acute necrotizing pancreatitis due to extensive pancreatic acinar cell death. Liu et al. [189] studied a total of 236 consecutive patients with AP and concluded that assessing circulating histones in plasma within 48 h of symptom onset can predict persistent organ failure and mortality. Although these two studies are encouraging for the use of circulating histones in predicting AP severity, Biberici Keskin et al. [192] concluded, in a small patient sample, that serum histone levels did not significantly differ between the severe and mild AP groups.

#### 7.26. Inter-Cellular Adhesion Molecule 1

Inter-cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) can play an important role in many biological processes, such as inflammation, by the adhesion of cell-to-cell or cell-to-extracellular matrix [193]. Zhu et al. [194], in their prospective study population of 86 consecutive patients with AP, they verified that for a cut-off of 25 ng/mL ICAM-1 was a good marker for distinguishing mild from severe AP, with a sensitivity and specificity of 61.1% and 71.4%, respectively. They also concluded that the ICAM-1 test was a simple, rapid, and reliable method in clinical practice.

### 8. Proteomic Profiling

Proteomics or protein pattern analysis is the characterization and quantitation of proteins in tissue and body fluids constituting a novel and rapidly expanding field used to compare protein expression patterns between disease states [195,196]. Fétaud et al. [197] concluded that proteomic analysis is a very interesting tool to identify changes characterizing pancreatic tissue damage and new potential biomarkers of AP severity. This method may increase our knowledge of the molecular mechanisms underlying AP and thus enhance new diagnostic and prognostic biomarkers [198,199]. The serum proteomic profile has features that can differentiate mild from severe AP. Papachristou et al. [196] verified 18 different signal intensity clusters out of 72 spectral clusters. Classification and regression tree (CART) analysis showed a primary splitter at 11,720 Da. After analysis, it was found to have a sensitivity of 100% and specificity of 81% in discriminating mild from severe acute pancreatitis. Proteomic profiling has also been used to differentiate disease states from non-disease states. In this respect, it could be used to assess disease severity and predict the clinical course of AP. A recent study assessed the use of proteomic profiling in discriminating severe from mild AP early in the course of the disease. The initial analysis of admission serum from 28 AP patients (7 severe and 21 mild) provided specific distinctive proteomic patterns, including peak clusters of interest relating to serum amyloid A.

### 9. Metabolomic Profiling

Metabolomics is a systematic approach for the analysis of biological samples. It can provide detailed information of the metabolic changes taking place in an organism. Metabolite profiling by using nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry has been widely applied for analyzing physiological and/or pathological conditions, such as AP. In the presence of pancreatic inflammation, metabolic abnormalities appear before both the transformation of tissue structure and changes in function [200]. The identification of these metabolic changes may promote an understanding of the pathophysiological events in AP. Ma et al. [200] verified a correlation between glucose, lactate,

betaine, choline, glycerophosphocholine/phosphocoline, leucine/iso-leucine/valine, and several lipids with acute necrotizing pancreatitis. Xiao et al. [201] showed that 3-hydroxybutyric acid and citric acid were potential biomarkers of the prognosis of AP, allowing for the distinction of mild from severe AP.

## 10. Clinical Relevance and Future Directions

Several multifactorial scoring systems and biochemical markers have been evaluated during the last decades.

Numerous biochemical markers have been studied as potential early predictors of the severity of AP so that the therapeutic approach can be optimally adapted to prevent both local and systemic complications. In Tables 1 and 2, the multifactorial scoring systems and biochemical markers are summarized, which are more studied and representative in the prognosis of AP.

**Table 1.** Clinically relevant multifactorial scoring systems predicting disease severity in AP.

Multifactorial Scoring System	Cut-Off	Time	AUC <sup>1</sup>	References
Ranson score	≥3	48 h	0.81–0.88	[36,58,61,124]
Glasgow score	2	48 h	0.73–0.784	[40,41,58]
APACHE-II <sup>2</sup>	7	24 h	0.80–0.895	[49,50,58,124]
APACHE-O <sup>3</sup>	7	24 h	0.893	[49]
BISAP <sup>4</sup>	≥3	24 h	0.79–0.875	[36,43,58,61,124]
SIRS <sup>5</sup>	≥2	24 h	0.73	[58,61]
PASS <sup>6</sup>	>160	24 h	0.71	[40]

<sup>1</sup> AUC: Area under the curve; <sup>2</sup> APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; <sup>3</sup> APACHE-O: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score-Obesity; <sup>4</sup> BISAP: Bedside Index of Severity in AP score; <sup>5</sup> SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome; <sup>6</sup> PASS: Pancreatitis Activity Scoring System.

**Table 2.** Clinically relevant biochemical markers predicting disease severity in AP.

Marker	Cut-Off	Time	AUC <sup>1</sup>	References
IL <sup>2-6</sup>	50 pg/mL	24 h	0.90	[58]
IL <sup>2-8</sup>	196 pg/mL	preoperative	0.778	[115]
CRP <sup>3</sup>	150 mg/L	24 h	0.61	[119]
CRP <sup>3</sup>	150 mg/L	48 h	0.73–0.91	[58,119,124]
PCT <sup>4</sup>	0.5 ng/mL	24 h	0.86–0.91	[131,134]
PCT <sup>4</sup>	1.77 ng/mL	24 h	0.797	[130]
Hepcidin	234.4 ng/mL	24 h	0.82	[144]
OAC <sup>5</sup>	32.40 nM	24 h	1	[183]
RDW <sup>6</sup>	13.35%	24 h	0.787	[168]
BUN <sup>7</sup>	5.945 mg/dL	24 h	0.677	[168]

<sup>1</sup> AUC: Area under the curve; <sup>2</sup> IL: Interleukin; <sup>3</sup> CRP: C-reactive protein; <sup>4</sup> PCT: Procalcitonin; <sup>5</sup> OAC: Oleic acid chlorohydrin; <sup>6</sup> RDW: Red blood cell distribution width; <sup>7</sup> BUN: Blood urea nitrogen.

At this moment, no laboratory test has consistent accuracy for the prediction of AP severity [25].

The majority of physicians and guidelines consider the CRP at 48 h after symptom onset as the gold standard for disease severity assessment.

The clinical presentation of AP is very variable. Banks et al. [6] classified AP as mild (uneventful clinical course), moderately severe (local complication or transient organ failure), and severe, characterized by the persistence of multiorgan failure. Patients with severe AP are at an increased risk of developing infected necrosis that is associated with very high morbidity and mortality. The actual management of AP is based on parenteral intravenous fluid therapy, pain control, and adequate nutrition. In cases of infected necrotizing pancreatitis, an endoscopic or surgical step-up approach is evaluated according to the local complication present [202]. Due to its complexity, AP management requires a multidisciplinary approach, such as a surgeon, a gastroenterologist, and a radiologist.

The evolution of new techniques, namely the recognition of both genetic, transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiles and functional images, allows for the identification of specific patterns of various pathological processes. These specific patterns can also be used in AP for the selection and validation of new biochemical markers of severity.

## 11. Conclusions

Despite intense research on the pathophysiology of AP, overall disease mortality has not significantly improved. Several studies have shown that early aggressive management reduces morbidity and mortality. In this sense, early diagnosis and timely assessment of the severity are essential. However, an ideal multifactorial scoring system and/or biochemical marker for early assessment of the severity of AP has yet to be defined.

Based on the analysis of available data and evidence, the authors suggest the use of the BISAP score as a multifactorial scoring system and the CRP at 48 h of presentation as the biochemical marker due to their availability, simplicity, and capability to predict AP severity.

It is critical to design and conduct large population-based multicenter studies to identify parameters that allow for the definition of multifactorial scores or biomarkers to predict AP severity and monitor disease progression that can be used routinely.

**Author Contributions:** P.S.-V. and A.M.A. read articles of multifactorial and biomarkers of prognosis of acute pancreatitis. P.S.-V. wrote de review. P.S.-V., A.M.A., M.C.-B., A.G., M.F.B., J.G.T. read and approved the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by FCT, Portugal (Strategic Project PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER.

**Acknowledgments:** P.S.-V. is grateful to the members of my research group for their discussion and suggestions during the course of this review.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Peery, A.F.; Dellon, E.S.; Lund, J.; Crockett, S.D.; McGowan, C.E.; Bulsiewicz, W.J.; Gangarosa, L.M.; Thiny, M.T.; Stizenberg, K.; Morgan, D.R. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 1179–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Silva-Vaz, P.; Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Murine Models of Acute Pancreatitis: A Critical Appraisal of Clinical Relevance. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Samanta, J.; Dhaka, N.; Gupta, P.; Singh, A.K.; Yadav, T.D.; Gupta, V.; Sinha, S.K.; Kochhar, R. Comparative study of the outcome between alcohol and gallstone pancreatitis in a high-volume tertiary care center. *JGH Open Access J. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *3*, 338–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Szentesi, A.; Toth, E.; Balint, E.; Fanczal, J.; Madacsy, T.; Laczko, D.; Ignath, I.; Balazs, A.; Pallagi, P.; Maleth, J.; et al. Analysis of Research Activity in Gastroenterology: Pancreatitis Is in Real Danger. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yadav, D.; Ng, B.; Saul, M.; Kennard, E.D. Relationship of serum pancreatic enzyme testing trends with the diagnosis of acute pancreatitis. *Pancreas* **2011**, *40*, 383–389. [[CrossRef](#)]
6. Banks, P.A.; Bollen, T.L.; Dervenis, C.; Gooszen, H.G.; Johnson, C.D.; Sarr, M.G.; Tsiotos, G.G.; Vege, S.S. Classification of acute pancreatitis—2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* **2013**, *62*, 102–111. [[CrossRef](#)]
7. Parniczky, A.; Kui, B.; Szentesi, A.; Balazs, A.; Szucs, A.; Mosztbacher, D.; Czimmer, J.; Sarlos, P.; Bajor, J.; Godi, S.; et al. Prospective, Multicentre, Nationwide Clinical Data from 600 Cases of Acute Pancreatitis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165309. [[CrossRef](#)]
8. Gurusamy, K.S.; Nagendran, M.; Davidson, B.R. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for acute gallstone pancreatitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**. [[CrossRef](#)]
9. Saluja, A.; Dudeja, V.; Dawra, R.; Sah, R.P. Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1979–1993. [[CrossRef](#)]

10. Wang, G.J.; Gao, C.F.; Wei, D.; Wang, C.; Ding, S.Q. Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 1427–1430. [[CrossRef](#)]
11. Testoni, P.A. Acute recurrent pancreatitis: Etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 16891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhang, B.; Li, S.L.; Xie, H.L.; Fan, J.W.; Gu, C.W.; Kang, C.; Teng, M.J. Effects of silencing the DUSP1 gene using lentiviral vector-mediated siRNA on the release of proinflammatory cytokines through regulation of the MAPK signaling pathway in mice with acute pancreatitis. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 2213–2224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yu, J.H.; Kim, H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 17324–17329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Criddle, D.N. Reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup> stores and acute pancreatitis; a step closer to therapy? *Cell Calcium* **2016**, *60*, 180–189. [[CrossRef](#)]
15. Escobar, J.; Pereda, J.; Arduini, A.; Sandoval, J.; Moreno, M.L.; Pérez, S.; Sabater, L.; Aparisi, L.; Cassinello, N.; Hidalgo, J. Oxidative and nitrosative stress in acute pancreatitis. Modulation by pentoxifylline and oxypurinol. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 122–130. [[CrossRef](#)]
16. Venglovecz, V.; Rakonczay, Z., Jr.; Ozsvari, B.; Takacs, T.; Lonovics, J.; Varro, A.; Gray, M.A.; Argent, B.E.; Hegyi, P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut* **2008**, *57*, 1102–1112. [[CrossRef](#)]
17. Maleth, J.; Balazs, A.; Pallagi, P.; Balla, Z.; Kui, B.; Katona, M.; Judak, L.; Nemeth, I.; Kemeny, L.V.; Rakonczay, Z., Jr.; et al. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 427–439. [[CrossRef](#)]
18. Lee, M.G.; Muallem, S. Pancreatitis: The neglected duct. *Gut* **2008**, *57*, 1037–1039. [[CrossRef](#)]
19. Toth, E.; Maleth, J.; Zavogyan, N.; Fanczal, J.; Grassalkovich, A.; Erdos, R.; Pallagi, P.; Horvath, G.; Tretter, L.; Balint, E.R.; et al. Novel mitochondrial transition pore inhibitor N-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 5879–5898. [[CrossRef](#)]
20. Pallagi, P.; Venglovecz, V.; Rakonczay, Z., Jr.; Borka, K.; Korompay, A.; Ozsvari, B.; Judak, L.; Sahin-Toth, M.; Geisz, A.; Schnur, A.; et al. Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl(-) channels and luminal anion exchangers. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 2228–2239. [[CrossRef](#)]
21. Rau, B.M.; Kruger, C.M.; Schilling, M.K. Anti-cytokine strategies in acute pancreatitis: Pathophysiological insights and clinical implications. *Rocz. Akad. Med. Bialymst. (1995)* **2005**, *50*, 106–115.
22. Chen, P.; Huang, L.; Sun, Y.; Yuan, Y. Upregulation of PIAS1 protects against sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis associated with acute lung injury. *Cytokine* **2011**, *54*, 305–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Steer, M.L.; Meldolesi, J.; Figarella, C. Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig. Dis. Sci.* **1984**, *29*, 934–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhang, X.-X.; Deng, L.-H.; Chen, W.-W.; Shi, N.; Jin, T.; Lin, Z.-Q.; Ma, Y.; Jiang, K.; Yang, X.-N.; Xia, Q. Circulating microRNA 216 as a marker for the early identification of severe acute pancreatitis. *Am. J. Med. Sci.* **2017**, *353*, 178–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Leppaniemi, A.; Tolonen, M.; Tarasconi, A.; Segovia-Lohse, H.; Gamberini, E.; Kirkpatrick, A.W.; Ball, C.G.; Parry, N.; Sartelli, M.; Wolbrink, D.; et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis. *World J. Emerg. Surg.* **2019**, *14*, 27. [[CrossRef](#)]
26. Strimbu, K.; Tavel, J.A. What are biomarkers? *Curr. Opin. HIV AIDS* **2010**, *5*, 463. [[CrossRef](#)]
27. Kaplan, M.; Ates, I.; Akpınar, M.Y.; Yuksel, M.; Kuzu, U.B.; Kacar, S.; Coskun, O.; Kayacetin, E. Predictive value of C-reactive protein/albumin ratio in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2017**, *16*, 424–430. [[CrossRef](#)]
28. Tenner, S.; Baillie, J.; DeWitt, J.; Vege, S.S. American College of Gastroenterology guideline: Management of acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108*, 1400–1416. [[CrossRef](#)]
29. Ranson, J.; Rifkind, K.; Turner, J. Prognostic signs and nonoperative peritoneal lavage in acute pancreatitis. *Surg. Gynecol. Obstet.* **1976**, *143*, 209–219.
30. Wilson, C.; Heath, D.I.; Imrie, C.W. Prediction of outcome in acute pancreatitis: A comparative study of APACHE II, clinical assessment and multiple factor scoring systems. *Br. J. Surg.* **1990**, *77*, 1260–1264. [[CrossRef](#)]

31. Corfield, A.P.; Cooper, M.J.; Williamson, R.C.; Mayer, A.D.; McMahon, M.J.; Dickson, A.P.; Shearer, M.G.; Imrie, C.W. Prediction of severity in acute pancreatitis: Prospective comparison of three prognostic indices. *Lancet* **1985**, *2*, 403–407. [[CrossRef](#)]
32. McMahon, M.J.; Playforth, M.J.; Pickford, I.R. A comparative study of methods for the prediction of severity of attacks of acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1980**, *67*, 22–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pagliari, D.; Brizi, M.G.; Saviano, A.; Mancarella, F.A.; Dal Lago, A.A.; Serricchio, M.L.; Newton, E.E.; Attili, F.; Manfredi, R.; Gasbarrini, A. Clinical assessment and management of severe acute pancreatitis: A multi-disciplinary approach in the XXI century. *Eur. Rev. Med Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 771–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ranson, J.H.; Rifkind, K.M.; Roses, D.F.; Fink, S.D.; Eng, K.; Spencer, F.C. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg. Gynecol. Obstet.* **1974**, *139*, 69–81.
35. Ranson, J.H. The timing of biliary surgery in acute pancreatitis. *Ann. Surg.* **1979**, *189*, 654–663. [[CrossRef](#)]
36. Hagler, S.; Kumar, N. Evaluation of the BISAP scoring system in prognostication of acute pancreatitis—A prospective observational study. *Int. J. Surg.* **2018**, *54*, 76–81. [[CrossRef](#)]
37. Imrie, C.W.; Benjamin, I.S.; Ferguson, J.C.; McKay, A.J.; Mackenzie, I.; O'Neill, J.; Blumgart, L.H. A single-centre double-blind trial of Trasylol therapy in primary acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1978**, *65*, 337–341. [[CrossRef](#)]
38. Osborne, D.H.; Imrie, C.W.; Carter, D.C. Biliary surgery in the same admission for gallstone-associated acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1981**, *68*, 758–761. [[CrossRef](#)]
39. Blamey, S.L.; Imrie, C.W.; O'Neill, J.; Gilmour, W.H.; Carter, D.C. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut* **1984**, *25*, 1340–1346. [[CrossRef](#)]
40. Buxbaum, J.; Quezada, M.; Chong, B.; Gupta, N.; Yu, C.Y.; Lane, C.; Da, B.; Leung, K.; Shulman, I.; Pandol, S.; et al. The Pancreatitis Activity Scoring System predicts clinical outcomes in acute pancreatitis: Findings from a prospective cohort study. *Am. J. Gastroenterol.* **2018**, *113*, 755–764. [[CrossRef](#)]
41. Kiat, T.T.J.; Gunasekaran, S.K.; Junnarkar, S.P.; Low, J.K.; Woon, W.; Shelat, V.G. Are traditional scoring systems for severity stratification of acute pancreatitis sufficient? *Ann. Hepato-Biliary-Pancreat. Surg.* **2018**, *22*, 105–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Knaus, W.A.; Draper, E.A.; Wagner, D.P.; Zimmerman, J.E. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit. Care Med.* **1985**, *13*, 818–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wu, B.U.; Johannes, R.S.; Sun, X.; Tabak, Y.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: A large population-based study. *Gut* **2008**, *57*, 1698–1703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Malangoni, M.A.; Martin, A.S. Outcome of severe acute pancreatitis. *Am. J. Surg.* **2005**, *189*, 273–277. [[CrossRef](#)]
45. Blum, T.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A.B.; Lankisch, P.G. Fatal outcome in acute pancreatitis: Its occurrence and early prediction. *Pancreatology* **2001**, *1*, 237–241. [[CrossRef](#)]
46. Johnson, C.; Abu-Hilal, M. Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis. *Gut* **2004**, *53*, 1340–1344. [[CrossRef](#)]
47. Perez, A.; Whang, E.E.; Brooks, D.C.; Moore, F.D., Jr.; Hughes, M.D.; Sica, G.T.; Zinner, M.J.; Ashley, S.W.; Banks, P.A. Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extended necrosis and infected necrosis? *Pancreas* **2002**, *25*, 229–233. [[CrossRef](#)]
48. Chatzicostas, C.; Roussomoustakaki, M.; Vlachonikolis, I.G.; Notas, G.; Mouzas, I.; Samonakis, D.; Kouroumalis, E.A. Comparison of Ranson, APACHE II and APACHE III scoring systems in acute pancreatitis. *Pancreas* **2002**, *25*, 331–335. [[CrossRef](#)]
49. Papachristou, G.I.; Papachristou, D.J.; Avula, H.; Slivka, A.; Whitcomb, D.C. Obesity increases the severity of acute pancreatitis: Performance of APACHE-O score and correlation with the inflammatory response. *Pancreatology* **2006**, *6*, 279–285. [[CrossRef](#)]
50. Harshit Kumar, A.; Singh Griwan, M. A comparison of APACHE II, BISAP, Ranson's score and modified CTSI in predicting the severity of acute pancreatitis based on the 2012 revised Atlanta Classification. *Gastroenterol. Rep.* **2018**, *6*, 127–131. [[CrossRef](#)]
51. Chandra, S.; Murali, A.; Bansal, R.; Agarwal, D.; Holm, A. The Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis: A systematic review of prospective studies to determine predictive performance. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **2017**, *7*, 208–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Zheng, L.; Hong, W.; Geng, W.; Stock, S.; Pan, J. A comparison of the BISAP score and Amylase and BMI (CAB) score versus for predicting severe acute pancreatitis. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* **2019**, *82*, 397–400.
53. Vasudevan, S.; Goswami, P.; Sonika, U.; Thakur, B.; Sreenivas, V.; Saraya, A. Comparison of Various Scoring Systems and Biochemical Markers in Predicting the Outcome in Acute Pancreatitis. *Pancreas* **2018**, *47*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Arif, A.; Jaleel, F.; Rashid, K. Accuracy of BISAP score in prediction of severe acute pancreatitis. *Pak. J. Med. Sci.* **2019**, *35*, 1008–1012. [[CrossRef](#)]
55. Park, J.Y.; Jeon, T.J.; Ha, T.H.; Hwang, J.T.; Sinn, D.H.; Oh, T.H.; Shin, W.C.; Choi, W.C. Bedside index for severity in acute pancreatitis: Comparison with other scoring systems in predicting severity and organ failure. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2013**, *12*, 645–650. [[CrossRef](#)]
56. Wu, B.U.; Bakker, O.J.; Papachristou, G.I.; Besselink, M.G.; Repas, K.; van Santvoort, H.C.; Muddana, V.; Singh, V.K.; Whitcomb, D.C.; Gooszen, H.G. Blood urea nitrogen in the early assessment of acute pancreatitis: An international validation study. *Arch. Intern. Med.* **2011**, *171*, 669–676. [[CrossRef](#)]
57. Mounzer, R.; Langmead, C.J.; Wu, B.U.; Evans, A.C.; Bishehsari, F.; Muddana, V.; Singh, V.K.; Slivka, A.; Whitcomb, D.C.; Yadav, D.; et al. Comparison of existing clinical scoring systems to predict persistent organ failure in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1476–1482. [[CrossRef](#)]
58. Khanna, A.K.; Meher, S.; Prakash, S.; Tiwary, S.K.; Singh, U.; Srivastava, A.; Dixit, V. Comparison of Ranson, Glasgow, MOSS, SIRS, BISAP, APACHE-II, CTSI Scores, IL-6, CRP, and procalcitonin in predicting severity, organ failure, pancreatic necrosis, and mortality in acute pancreatitis. *Hpb Surg.* **2013**. [[CrossRef](#)]
59. Mofidi, R.; Duff, M.; Wigmore, S.; Madhavan, K.; Garden, O.; Parks, R. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br. J. Surg. Inc. Eur. J. Surg. Swiss Surg.* **2006**, *93*, 738–744. [[CrossRef](#)]
60. Singh, V.K.; Wu, B.U.; Bollen, T.L.; Repas, K.; Maurer, R.; Morteale, K.J.; Banks, P.A. Early systemic inflammatory response syndrome is associated with severe acute pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2009**, *7*, 1247–1251. [[CrossRef](#)]
61. Li, M.; Xing, X.K.; Lu, Z.H.; Guo, F.; Su, W.; Lin, Y.J.; Wang, D.H. Comparison of Scoring Systems in Predicting Severity and Prognosis of Hypertriglyceridemia-Induced Acute Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wu, B.U.; Batech, M.; Quezada, M.; Lew, D.; Fujikawa, K.; Kung, J.; Jamil, L.H.; Chen, W.; Afghani, E.; Reicher, S.; et al. Dynamic Measurement of Disease Activity in Acute Pancreatitis: The Pancreatitis Activity Scoring System. *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 1144–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ke, L.; Mao, W.; Li, X.; Zhou, J.; Li, G.; Ye, B.; Tong, Z.; Li, W. The Pancreatitis Activity Scoring System in Predicting Infection of Pancreatic Necrosis. *Am. J. Gastroenterol.* **2018**, *113*, 1393–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sahu, B.; Abbey, P.; Anand, R.; Kumar, A.; Tomer, S.; Malik, E. Severity assessment of acute pancreatitis using CT severity index and modified CT severity index: Correlation with clinical outcomes and severity grading as per the Revised Atlanta Classification. *Indian J. Radiol. Imaging* **2017**, *27*, 152–160. [[CrossRef](#)]
65. Yadav, A.K.; Sharma, R.; Kandasamy, D.; Bhalla, A.S.; Gamanagatti, S.; Srivastava, D.N.; Upadhyay, A.D.; Garg, P.K. Perfusion CT: Can it predict the development of pancreatic necrosis in early stage of severe acute pancreatitis? *Abdom. Imaging* **2015**, *40*, 488–499. [[CrossRef](#)]
66. Balthazar, E.J.; Ranson, J.H.; Naidich, D.P.; Megibow, A.J.; Caccavale, R.; Cooper, M.M. Acute pancreatitis: Prognostic value of CT. *Radiology* **1985**, *156*, 767–772. [[CrossRef](#)]
67. Balthazar, E.J.; Robinson, D.L.; Megibow, A.J.; Ranson, J.H. Acute pancreatitis: Value of CT in establishing prognosis. *Radiology* **1990**, *174*, 331–336. [[CrossRef](#)]
68. Morteale, K.J.; Mergo, P.J.; Taylor, H.M.; Wiesner, W.; Cantisani, V.; Ernst, M.D.; Kalantari, B.N.; Ros, P.R. Peripancreatic vascular abnormalities complicating acute pancreatitis: Contrast-enhanced helical CT findings. *Eur. J. Radiol.* **2004**, *52*, 67–72. [[CrossRef](#)]
69. Raghuvanshi, S.; Gupta, R.; Vyas, M.M.; Sharma, R. CT Evaluation of Acute Pancreatitis and its Prognostic Correlation with CT Severity Index. *J. Clin. Diagn. Res.* **2016**, *10*, Tc06-11. [[CrossRef](#)]
70. Avanesov, M.; Loser, A.; Smagarynska, A.; Keller, S.; Guerreiro, H.; Tahir, E.; Karul, M.; Adam, G.; Yamamura, J. Clinico-radiological comparison and short-term prognosis of single acute pancreatitis and recurrent acute pancreatitis including pancreatic volumetry. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206062. [[CrossRef](#)]



71. London, N.J.; Neoptolemos, J.P.; Lavelle, J.; Bailey, I.; James, D. Contrast-enhanced abdominal computed tomography scanning and prediction of severity of acute pancreatitis: A prospective study. *Br. J. Surg.* **1989**, *76*, 268–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bollen, T.L.; Singh, V.K.; Maurer, R.; Repas, K.; van Es, H.W.; Banks, P.A.; Mortele, K.J. A comparative evaluation of radiologic and clinical scoring systems in the early prediction of severity in acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2012**, *107*, 612–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Rickes, S.; Monkemuller, K.; Malfertheiner, P. Acute severe pancreatitis: Contrast-enhanced sonography. *Abdom. Imaging* **2007**, *32*, 362–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Golea, A.; Badea, R.; Socaciu, M.; Diaconu, B.; Iacob, D. Quantitative analysis of tissue perfusion using contrast-enhanced transabdominal ultrasound (CEUS) in the evaluation of the severity of acute pancreatitis. *Med. Ultrason.* **2010**, *12*, 198–204. [[PubMed](#)]
75. Rickes, S.; Uhle, C.; Kahl, S.; Kolfenbach, S.; Monkemuller, K.; Effenberger, O.; Malfertheiner, P. Echo enhanced ultrasound: A new valid initial imaging approach for severe acute pancreatitis. *Gut* **2006**, *55*, 74–78. [[CrossRef](#)]
76. Cai, D.; Parajuly, S.S.; Wang, H.; Wang, X.; Ling, W.; Song, B.; Li, Y.; Luo, Y. Accuracy of contrast-enhanced ultrasound compared with conventional ultrasound in acute pancreatitis: Diagnosis and complication monitoring. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *12*, 3189–3194. [[CrossRef](#)]
77. Skouras, C.; Davis, Z.A.; Sharkey, J.; Parks, R.W.; Garden, O.J.; Murchison, J.T.; Mole, D.J. Lung ultrasonography as a direct measure of evolving respiratory dysfunction and disease severity in patients with acute pancreatitis. *HPB Off. J. Int. Hepato Pancreato Biliary Assoc.* **2016**, *18*, 159–169. [[CrossRef](#)]
78. Sotoudehmanesh, R.; Hooshyar, A.; Kolahdoozan, S.; Zeinali, F.; Shahraeeni, S.; Keshtkar, A.A. Prognostic value of endoscopic ultrasound in acute pancreatitis. *Pancreatol.* **2010**, *10*, 702–706. [[CrossRef](#)]
79. Rana, S.S.; Bhasin, D.K.; Sharma, V.; Sharma, R.; Chaudhary, V.; Chhabra, P. Can early endoscopic ultrasound predict pancreatic necrosis in acute pancreatitis? *Ann. Gastroenterol.* **2014**, *27*, 404–408.
80. Lopes, C.V.; Pereira-Lima, J.; Hartmann, A.A. The role of linear endosonography for the diagnosis of acute pancreatitis when other methods failed. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2019**, *43*, 98–103. [[CrossRef](#)]
81. Li, X.; Guo, X.; Ji, H.; Niu, J.; Gao, P. Relationships between Metabolic Comorbidities and Occurrence, Severity, and Outcomes in Patients with Acute Pancreatitis: A Narrative Review. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 2645926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Mikolasevic, I.; Milic, S.; Orlic, L.; Poropat, G.; Jakopcic, I.; Franjic, N.; Klanac, A.; Kristo, N.; Stimac, D. Metabolic syndrome and acute pancreatitis. *Eur. J. Intern. Med.* **2016**, *32*, 79–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Deng, L.H.; Xue, P.; Xia, Q.; Yang, X.N.; Wan, M.H. Effect of admission hypertriglyceridemia on the episodes of severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 4558–4561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Szentesi, A.; Parniczky, A.; Vincze, A.; Bajor, J.; Godi, S.; Sarlos, P.; Gede, N.; Izbeki, F.; Halasz, A.; Marta, K.; et al. Multiple Hits in Acute Pancreatitis: Components of Metabolic Syndrome Synergize Each Other's Deteriorating Effects. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Lankisch, P.G.; Schirren, C.A. Increased body weight as a prognostic parameter for complications in the course of acute pancreatitis. *Pancreas* **1990**, *5*, 626–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ye, C.; Liu, L.; Ma, X.; Tong, H.; Gao, J.; Tai, Y.; Huang, L.; Tang, C.; Wang, R. Obesity Aggravates Acute Pancreatitis via Damaging Intestinal Mucosal Barrier and Changing Microbiota Composition in Rats. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 69. [[CrossRef](#)]
87. Krishna, S.G.; Hinton, A.; Oza, V.; Hart, P.A.; Sweit, E.; El-Dika, S.; Stanich, P.P.; Hussan, H.; Zhang, C.; Conwell, D.L. Morbid Obesity Is Associated With Adverse Clinical Outcomes in Acute Pancreatitis: A Propensity-Matched Study. *Am. J. Gastroenterol.* **2015**, *110*, 1608–1619. [[CrossRef](#)]
88. Dobszai, D.; Matrai, P.; Gyongyi, Z.; Csupor, D.; Bajor, J.; Eross, B.; Miko, A.; Szako, L.; Meczker, A.; Hagendorn, R.; et al. Body-mass index correlates with severity and mortality in acute pancreatitis: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 729–743. [[CrossRef](#)]
89. Cruz-Monserrate, Z.; Conwell, D.L.; Krishna, S.G. The Impact of Obesity on Gallstone Disease, Acute Pancreatitis, and Pancreatic Cancer. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2016**, *45*, 625–637. [[CrossRef](#)]
90. Martinez, J.; Johnson, C.D.; Sanchez-Paya, J.; de Madaria, E.; Robles-Diaz, G.; Perez-Mateo, M. Obesity is a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: An updated meta-analysis. *Pancreatol.* **2006**, *6*, 206–209. [[CrossRef](#)]

91. Hong, S.; Qiwen, B.; Ying, J.; Wei, A.; Chaoyang, T. Body mass index and the risk and prognosis of acute pancreatitis: A meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *23*, 1136–1143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Valdivielso, P.; Ramirez-Bueno, A.; Ewald, N. Current knowledge of hypertriglyceridemic pancreatitis. *Eur. J. Intern. Med.* **2014**, *25*, 689–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Zeng, Y.; Zhang, W.; Lu, Y.; Huang, C.; Wang, X. Impact of hypertriglyceridemia on the outcome of acute biliary pancreatitis. *Am. J. Med. Sci.* **2014**, *348*, 399–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Reddy, S.K.; Zhan, M.; Alexander, H.R.; El-Kamary, S.S. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with benign gastrointestinal disorders. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 8301–8311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Yoon, S.B.; Lee, I.S.; Choi, M.H.; Lee, K.; Ham, H.; Oh, H.J.; Park, S.H.; Lim, C.H.; Choi, M.G. Impact of Fatty Liver on Acute Pancreatitis Severity. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2017**, *2017*, 4532320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Nojgaard, C. Prognosis of acute and chronic pancreatitis—A 30-year follow-up of a Danish cohort. *Dan. Med. Bull.* **2010**, *57*, B4228.
97. Miko, A.; Farkas, N.; Garami, A.; Szabo, I.; Vincze, A.; Veres, G.; Bajor, J.; Alizadeh, H.; Rakonczay, Z., Jr.; Vigh, E.; et al. Preexisting Diabetes Elevates Risk of Local and Systemic Complications in Acute Pancreatitis: Systematic Review and Meta-analysis. *Pancreas* **2018**, *47*, 917–923. [[CrossRef](#)]
98. Shen, H.N.; Lu, C.L.; Li, C.Y. Effect of diabetes on severity and hospital mortality in patients with acute pancreatitis: A national population-based study. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 1061–1066. [[CrossRef](#)]
99. Nawaz, H.; O’Connell, M.; Papachristou, G.I.; Yadav, D. Severity and natural history of acute pancreatitis in diabetic patients. *Pancreatolgy* **2015**, *15*, 247–252. [[CrossRef](#)]
100. Kylanpaa, M.L.; Repo, H.; Puolakkainen, P.A. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 2867–2872. [[CrossRef](#)]
101. Martins, F.D.O.; Gomes, B.C.; Rodrigues, A.S.; Rueff, J. Genetic Susceptibility in Acute Pancreatitis: Genotyping of GSTM1, GSTT1, GSTP1, CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, LTA, TNFRSF1B, and TP53 Gene Variants. *Pancreas* **2017**, *46*, 71–76. [[CrossRef](#)]
102. Ozhan, G.; Yanar, H.T.; Ertekin, C.; Alpertunga, B. Polymorphisms in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) gene in patients with acute pancreatitis. *Mediat. Inflamm.* **2010**, *2010*, 482950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. El-Ashmawy, N.E.; Khedr, N.F.; El-Bahrawy, H.A.; Hamada, O.B. Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha level by lycopene is comparable to methylprednisolone in acute pancreatitis. *Dig. Liver Dis.* **2018**, *50*, 601–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Exley, A.R.; Leese, T.; Holliday, M.P.; Swann, R.A.; Cohen, J. Endotoxaemia and serum tumour necrosis factor as prognostic markers in severe acute pancreatitis. *Gut* **1992**, *33*, 1126–1128. [[CrossRef](#)]
105. Paaianen, H.; Laato, M.; Jaakkola, M.; Pulkki, K.; Niinikoski, J.; Nordback, I. Serum tumour necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity of acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1995**, *82*, 271–273. [[CrossRef](#)]
106. Norman, J.; Franz, M.; Messina, J.; Riker, A.; Fabri, P.J.; Rosemurgy, A.S.; Gower, W.R., Jr. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery* **1995**, *117*, 648–655. [[CrossRef](#)]
107. Heresbach, D.; Letourneur, J.P.; Bahon, I.; Pagenault, M.; Guillou, Y.M.; Dyard, F.; Fauchet, R.; Malledant, Y.; Bretagne, J.F.; Gosselin, M. Value of early blood Th-1 cytokine determination in predicting severity of acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **1998**, *33*, 554–560. [[CrossRef](#)]
108. Chen, C.C.; Wang, S.S.; Lee, F.Y.; Chang, F.Y.; Lee, S.D. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 213–218. [[CrossRef](#)]
109. Matull, W.R.; Pereira, S.P.; O’Donohue, J.W. Biochemical markers of acute pancreatitis. *J. Clin. Pathol.* **2006**, *59*, 340–344. [[CrossRef](#)]
110. Pastor, C.M.; Morel, D.R.; Vonlaufen, A.; Schiffer, E.; Lescuyer, P.; Frossard, J.L. Delayed production of IL-18 in lungs and pancreas of rats with acute pancreatitis. *Pancreatolgy* **2010**, *10*, 752–757. [[CrossRef](#)]
111. Soyalp, M.; Yalcin, M.; Oter, V.; Ozgonul, A. Investigation of procalcitonin, IL-6, oxidative stress index (OSI) plasma and tissue levels in experimental mild and severe pancreatitis in rats. *Bratisl. Lek. Listy* **2017**, *118*, 137–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Jiang, C.F.; Shiao, Y.C.; Ng, K.W.; Tan, S.W. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J. Chin. Med. Assoc.* **2004**, *67*, 442–446. [[PubMed](#)]

113. Li, Y.; Bai, J.; He, B.; Wang, N.; Wang, H.; Liu, D. Weak association between the interleukin-8 rs4073 polymorphism and acute pancreatitis: A cumulative meta-analysis. *BMC Med. Genet.* **2019**, *20*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Gross, V.; Andreesen, R.; Leser, H.G.; Ceska, M.; Liehl, E.; Lausen, M.; Farthmann, E.H.; Scholmerich, J. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur. J. Clin. Investig.* **1992**, *22*, 200–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Rau, B.; Steinbach, G.; Gansauge, F.; Mayer, J.M.; Grunert, A.; Beger, H.G. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* **1997**, *41*, 832–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Dugernier, T.L.; Laterre, P.F.; Wittebole, X.; Roeseler, J.; Latinne, D.; Reynaert, M.S.; Pugin, J. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: Correlation with local and systemic complications. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *168*, 148–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Wilson, C.; Heads, A.; Shenkin, A.; Imrie, C. C-reactive protein, antiproteases and complement factors as objective markers of severity in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1989**, *76*, 177–181. [[CrossRef](#)]
118. Lelubre, C.; Anselin, S.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Biston, P.; Piagnerelli, M. Interpretation of C-reactive protein concentrations in critically ill patients. *BioMed Res. Int.* **2013**. [[CrossRef](#)]
119. Cardoso, F.S.; Ricardo, L.B.; Oliveira, A.M.; Canena, J.M.; Horta, D.V.; Papoila, A.L.; Deus, J.R. C-reactive protein prognostic accuracy in acute pancreatitis: Timing of measurement and cutoff points. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *25*, 784–789. [[CrossRef](#)]
120. Mayer, A.; McMahon, M.; Bowen, M.; Cooper, E. C reactive protein: An aid to assessment and monitoring of acute pancreatitis. *J. Clin. Pathol.* **1984**, *37*, 207–211. [[CrossRef](#)]
121. Lavin, M. Assessment of clinical severity and prognosis. In *The Pancreas*; Berger, H.G., Warshan, A.L., Buchler, M.W., Carr-Locke, D., Neoptolemos, J.P., Russell, C., Sarr, M.G., Eds.; Blackwell Science: Oxford, UK, 1998; pp. 489–502.
122. Büchler, M.; Malferteiner, P.; Schoetensack, C.; Uhl, W.; Beger, H.G. Sensitivity of antiproteases, complement factors and C-reactive protein in detecting pancreatic necrosis. Results of a prospective clinical study. *Int. J. Pancreatol.* **1986**, *1*, 227–235. [[PubMed](#)]
123. Leese, T.; Shaw, D.; Holliday, M. Prognostic markers in acute pancreatitis: Can pancreatic necrosis be predicted? *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **1988**, *70*, 227. [[PubMed](#)]
124. Miko, A.; Vigh, E.; Matrai, P.; Soos, A.; Garami, A.; Balasko, M.; Czako, L.; Mosdosi, B.; Sarlos, P.; Eross, B.; et al. Computed Tomography Severity Index vs. Other Indices in the Prediction of Severity and Mortality in Acute Pancreatitis: A Predictive Accuracy Meta-analysis. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Farkas, N.; Hanak, L.; Miko, A.; Bajor, J.; Sarlos, P.; Czimmer, J.; Vincze, A.; Godi, S.; Peci, D.; Varju, P.; et al. A Multicenter, International Cohort Analysis of 1435 Cases to Support Clinical Trial Design in Acute Pancreatitis. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1092. [[CrossRef](#)]
126. Uhl, W.; Büchler, M.; Malferteiner, P.; Martini, M.; Beger, H.G. PMN-elastase in comparison with CRP, antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. *Pancreas* **1991**, *6*, 253–259. [[CrossRef](#)]
127. Pieri, G.; Agarwal, B.; Burroughs, A.K. C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* **2014**, *27*, 113.
128. Parniczky, A.; Lantos, T.; Toth, E.M.; Szakacs, Z.; Godi, S.; Hagendorn, R.; Illes, D.; Koncz, B.; Marta, K.; Miko, A.; et al. Antibiotic therapy in acute pancreatitis: From global overuse to evidence based recommendations. *Pancreatology* **2019**, *19*, 488–499. [[CrossRef](#)]
129. Al-Nawas, B.; Krammer, I.; Shah, P.M. Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *Eur. J. Med. Res.* **1996**, *1*, 331–333.
130. Woo, S.M.; Noh, M.H.; Kim, B.G.; Hsing, C.T.; Han, J.S.; Ryu, S.H.; Seo, J.M.; Yoon, H.A.; Jang, J.S.; Choi, S.R.; et al. Comparison of serum procalcitonin with Ranson, APACHE-II, Glasgow and Balthazar CT severity index scores in predicting severity of acute pancreatitis. *Korean J. Gastroenterol.* **2011**, *58*, 31–37. [[CrossRef](#)]
131. Purkayastha, S.; Chow, A.; Athanasiou, T.; Cambaroudis, A.; Panesar, S.; Kinross, J.; Tekkis, P.; Darzi, A. Does serum procalcitonin have a role in evaluating the severity of acute pancreatitis? A question revisited. *World J. Surg.* **2006**, *30*, 1713–1721. [[CrossRef](#)]
132. Neoptolemos, J.P. Procalcitonin strip test in the early detection of severe acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **2001**, *88*, 1418. [[PubMed](#)]

133. Dias, B.H.; Rozario, A.P.; Olakkengil, S.A.; Anirudh, V. Procalcitonin Strip Test as an Independent Predictor in Acute Pancreatitis. *Indian J. Surg.* **2015**, *77*, 1012–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Mofidi, R.; Suttie, S.A.; Patil, P.V.; Ogston, S.; Parks, R.W. The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: Systematic review. *Surgery* **2009**, *146*, 72–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Siriwardena, A.K.; Jegatheeswaran, S.; Mason, J.M.; Baltatzis, M.; Chan, A.; Sheen, A.J.; O'Reilly, D.; Jamdar, S.; Deshpande, R.; de Liguori Carino, N.; et al. PROCalcitonin-based algorithm for antibiotic use in Acute Pancreatitis (PROCAP): Study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **2019**, *20*, 463. [[CrossRef](#)]
136. Lee, W.L.; Downey, G.P. Leukocyte elastase: Physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *164*, 896–904. [[CrossRef](#)]
137. Dominguez-Munoz, J.E.; Villanueva, A.; Larino, J.; Mora, T.; Barreiro, M.; Iglesias-Canle, J.; Iglesias-Garcia, J. Accuracy of plasma levels of polymorphonuclear elastase as early prognostic marker of acute pancreatitis in routine clinical conditions. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *18*, 79–83. [[CrossRef](#)]
138. Ikei, S.; Ogawa, M.; Yamaguchi, Y. Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1998**, *13*, 1274–1283. [[CrossRef](#)]
139. Mackman, N. The many faces of tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7* (Suppl. S1), 136–139. [[CrossRef](#)]
140. Andersson, E.; Axelsson, J.; Eckerwall, G.; Ansari, D.; Andersson, R. Tissue factor in predicted severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 6128–6134. [[CrossRef](#)]
141. Ou, Z.B.; Miao, C.M.; Ye, M.X.; Xing, D.P.; He, K.; Li, P.Z.; Zhu, R.T.; Gong, J.P. Investigation for role of tissue factor and blood coagulation system in severe acute pancreatitis and associated liver injury. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *85*, 380–388. [[CrossRef](#)]
142. Babbitt, J.L.; Huang, F.W.; Wrighting, D.M.; Xia, Y.; Sidis, Y.; Samad, T.A.; Campagna, J.A.; Chung, R.T.; Schneyer, A.L.; Woolf, C.J. Bone morphogenetic protein signaling by hepcidin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Kulaksiz, H.; Fein, E.; Redecker, P.; Stremmel, W.; Adler, G.; Cetin, Y. Pancreatic b-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J. Endocrinol.* **2008**, *197*, 241–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Arabul, M.; Celik, M.; Aslan, O.; Torun, S.; Beyazit, Y.; Alper, E.; Kandemir, A.; Unsal, B. Hepcidin as a predictor of disease severity in acute pancreatitis: A single center prospective study. *Hepatogastroenterology* **2013**, *60*, 595–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Katan, M.; Muller, B.; Christ-Crain, M. Copeptin: A new and promising diagnostic and prognostic marker. *Crit. Care* **2008**, *12*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Isman, F.K.; Zulfikaroglu, B.; Isbilen, B.; Ozalp, N.; Ozmen, M.M.; Bilgic, I.; Koc, M. Copeptin is a predictive biomarker of severity in acute pancreatitis. *Am. J. Emerg. Med.* **2013**, *31*, 690–692. [[CrossRef](#)]
147. Nebiker, C.A.; Staubli, S.; Schafer, J.; Bingisser, R.; Christ-Crain, M.; Dell-Kuster, S.; Mueller, C.; Scamardi, K.; Viehl, C.T.; Kolleth, D.; et al. Cortisol Outperforms Novel Cardiovascular, Inflammatory, and Neurohumoral Biomarkers in the Prediction of Outcome in Acute Pancreatitis. *Pancreas* **2018**, *47*, 55–64. [[CrossRef](#)]
148. Ida, S.; Fujimura, Y.; Hirota, M.; Imamura, Y.; Ozaki, N.; Suyama, K.; Hashimoto, D.; Ohmuraya, M.; Tanaka, H.; Takamori, H.; et al. Significance of endothelial molecular markers in the evaluation of the severity of acute pancreatitis. *Surg. Today* **2009**, *39*, 314–319. [[CrossRef](#)]
149. Milnerowicz, S.; Milnerowicz, H.; Nabzdyk, S.; Jablonowska, M.; Grabowski, K.; Tabola, R. Plasma endothelin-1 levels in pancreatic inflammations. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2013**, *22*, 361–368.
150. Bennett, J.; Cooper, D.; Balakrishnan, A.; Rhodes, M.; Lewis, M. Is there a role for serum endothelin in predicting the severity of acute pancreatitis? *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2006**, *5*, 290–293.
151. Nukarinen, E.; Lindstrom, O.; Kuuliala, K.; Kylanpaa, L.; Pettila, V.; Puolakkainen, P.; Kuuliala, A.; Hamalainen, M.; Moilanen, E.; Repo, H.; et al. Association of Matrix Metalloproteinases -7, -8 and -9 and TIMP -1 with Disease Severity in Acute Pancreatitis. A Cohort Study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161480. [[CrossRef](#)]
152. Wereszczynska-Siemiakowska, U.; Siemiakowski, A.; Swidnicka-Siergiejko, A.; Mroczko, B.; Dabrowski, A. The imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in acute pancreatitis. *Z. Gastroenterol.* **2015**, *53*, 199–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

153. Guo, J.; Xue, P.; Yang, X.N.; Liu, X.B.; Huang, W.; Xia, Q. Serum matrix metalloproteinase-9 is an early marker of pancreatic necrosis in patients with severe acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* **2012**, *59*, 1594–1598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Chen, P.; Yuan, Y.; Wang, S.; Zhan, L.; Xu, J. Serum matrix metalloproteinase 9 as a marker for the assessment of severe acute pancreatitis. *Tohoku J. Exp. Med.* **2006**, *208*, 261–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Kim, H.J.; Lee, H.W. Important predictor of mortality in patients with end-stage liver disease. *Clin. Mol. Hepatol.* **2013**, *19*, 105. [[CrossRef](#)]
156. Holliday, M.P.; Shaw, D.; Thomas, W.M.; Leese, T. Threshold for albumin as a prognostic marker in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **1989**, *76*, 472–473. [[CrossRef](#)]
157. Gonzalez-Gasch, A.; de Casasola, G.G.; Martin, R.B.; Herreros, B.; Guijarro, C. A simple prognostic score for risk assessment in patients with acute pancreatitis. *Eur. J. Intern. Med.* **2009**, *20*, e43–e48. [[CrossRef](#)]
158. Hong, W.; Lin, S.; Zippi, M.; Geng, W.; Stock, S.; Basharat, Z.; Cheng, B.; Pan, J.; Zhou, M. Serum Albumin Is Independently Associated with Persistent Organ Failure in Acute Pancreatitis. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *2017*, 5297143. [[CrossRef](#)]
159. Huai, J.; Shao, Y.; Sun, X.; Jin, Y.; Wu, J.; Huang, Z. Melatonin ameliorates acute necrotizing pancreatitis by the regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Pancreatology* **2012**, *12*, 257–263. [[CrossRef](#)]
160. Gutierrez-Jimenez, A.A.; Castro-Jimenez, E.; Lagunes-Cordoba, R. Total serum calcium and corrected calcium as severity predictors in acute pancreatitis. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **2014**, *79*, 13–21. [[CrossRef](#)]
161. Yu, S.; Wu, D.; Jin, K.; Yin, L.; Fu, Y.; Liu, D.; Zhang, L.; Yu, X.; Xu, J. Low Serum Ionized Calcium, Elevated High-Sensitivity C-Reactive Protein, Neutrophil-Lymphocyte Ratio, and Body Mass Index (BMI) Are Risk Factors for Severe Acute Pancreatitis in Patients with Hypertriglyceridemia Pancreatitis. *Med Sci. Monit. Int. Med J. Exp. Clin. Res.* **2019**, *25*, 6097–6103. [[CrossRef](#)]
162. Whitcomb, D.C.; Lowe, M.E. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Wu, H.C.; Wang, H.P.; Chen, C.C.; Wu, C.H.; Liu, T.H.; Wang, C.H.; Shih, L.N.; Liao, W.C. Urinary trypsinogen-2 level and local complications of acute pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Yasuda, H.; Kataoka, K.; Takeyama, Y.; Takeda, K.; Ito, T.; Mayumi, T.; Isaji, S.; Mine, T.; Kitagawa, M.; Kiriya, S.; et al. Usefulness of urinary trypsinogen-2 and trypsinogen activation peptide in acute pancreatitis: A multicenter study in Japan. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 107–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Deng, L.; Wang, L.; Yong, F.; Xiong, J.; Jin, T.; De La Iglesia-Garcia, D.; Bharucha, S.; Altaf, K.; Huang, W.; Xia, Q. Prediction of the severity of acute pancreatitis on admission by carboxypeptidase-B activation peptide: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Biochem.* **2015**, *48*, 740–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Goyal, H.; Awad, H.; Hu, Z.-D. Prognostic value of admission red blood cell distribution width in acute pancreatitis: A systematic review. *Ann. Transl. Med.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Gravito-Soares, M.; Gravito-Soares, E.; Gomes, D.; Almeida, N.; Tome, L. Red cell distribution width and red cell distribution width to total serum calcium ratio as major predictors of severity and mortality in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol.* **2018**, *18*, 108. [[CrossRef](#)]
168. Zhou, H.; Mei, X.; He, X.; Lan, T.; Guo, S. Severity stratification and prognostic prediction of patients with acute pancreatitis at early phase: A retrospective study. *Medicine* **2019**, *98*, e15275. [[CrossRef](#)]
169. Harrison, D.A.; D'Amico, G.; Singer, M. The Pancreatitis Outcome Prediction (POP) Score: A new prognostic index for patients with severe acute pancreatitis. *Crit. Care Med.* **2007**, *35*, 1703–1708. [[CrossRef](#)]
170. Wu, B.U.; Johannes, R.S.; Sun, X.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. Early changes in blood urea nitrogen predict mortality in acute pancreatitis. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 129–135. [[CrossRef](#)]
171. Gan, S.I.; Romagnuolo, J. Admission hematocrit: A simple, useful and early predictor of severe pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2004**, *49*, 1946–1952. [[CrossRef](#)]
172. Parsa, N.; Faghih, M.; Garcia Gonzalez, F.; Moran, R.A.; Kamal, A.; Jalaly, N.Y.; Al-Grain, H.; Akshintala, V.S.; Makary, M.A.; Khashab, M.A.; et al. Early Hemoconcentration Is Associated With Increased Opioid Use in Hospitalized Patients with Acute Pancreatitis. *Pancreas* **2019**, *48*, 193–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Baillargeon, J.-D.; Orav, J.; Ramagopal, V.; Tenner, S.; Banks, P.A. Hemoconcentration as an early risk factor for necrotizing pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **1998**, *93*, 2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Brown, A.; Orav, J.; Banks, P.A. Hemoconcentration is an early marker for organ failure and necrotizing pancreatitis. *Pancreas* **2000**, *20*, 367–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

175. Lankisch, P.G.; Mahlke, R.; Blum, T.; Bruns, A.; Bruns, D.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A.B. Hemoconcentration: An early marker of severe and/or necrotizing pancreatitis? A critical appraisal. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 2081–2085. [[CrossRef](#)]
176. Talamini, G.; Uomo, G.; Pezzilli, R.; Rabitti, P.G.; Billi, P.; Bassi, C.; Cavallini, G.; Pederzoli, P. Serum creatinine and chest radiographs in the early assessment of acute pancreatitis. *Am. J. Surg.* **1999**, *177*, 7–14. [[CrossRef](#)]
177. Muddana, V.; Whitcomb, D.C.; Khalid, A.; Slivka, A.; Papachristou, G.I. Elevated serum creatinine as a marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 164–170. [[CrossRef](#)]
178. Shearman, C.P.; Gosling, P.; Walker, K.J. Is low proteinuria an early predictor of severity of acute pancreatitis? *J. Clin. Pathol.* **1989**, *42*, 1132–1135. [[CrossRef](#)]
179. Zuidema, M.J.; van Santvoort, H.C.; Besselink, M.G.; van Ramshorst, B.; Boerma, D.; Timmer, R.; Bollen, T.L.; Weusten, B.L. The predictive value of proteinuria in acute pancreatitis. *Pancreatology* **2014**, *14*, 484–489. [[CrossRef](#)]
180. Orfanos, S.E.; Kotanidou, A.; Glynos, C.; Athanasiou, C.; Tsigkos, S.; Dimopoulou, I.; Sotiropoulou, C.; Zakyntinos, S.; Armaganidis, A.; Papapetropoulos, A.; et al. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: Correlation with inflammatory mediators. *Crit. Care Med.* **2007**, *35*, 199–206. [[CrossRef](#)]
181. Whitcomb, D.C.; Muddana, V.; Langmead, C.J.; Houghton, F.D., Jr.; Guenther, A.; Eagon, P.K.; Mayerle, J.; Aghdassi, A.A.; Weiss, F.U.; Evans, A.; et al. Angiopoietin-2, a regulator of vascular permeability in inflammation, is associated with persistent organ failure in patients with acute pancreatitis from the United States and Germany. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105*, 2287–2292. [[CrossRef](#)]
182. Franco-Pons, N.; Casas, J.; Fabrias, G.; Gea-Sorli, S.; de-Madaria, E.; Gelpi, E.; Closa, D. Fat necrosis generates proinflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis. *Ann. Surg.* **2013**, *257*, 943–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. de-Madaria, E.; Molero, X.; Bonjoch, L.; Casas, J.; Cardenas-Jaen, K.; Montenegro, A.; Closa, D. Oleic acid chlorohydrin, a new early biomarker for the prediction of acute pancreatitis severity in humans. *Ann. Intensive Care* **2018**, *8*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Harris, S.; Nadkarni, N.A.; Naina, H.V.; Vege, S.S. Splanchnic vein thrombosis in acute pancreatitis: A single-center experience. *Pancreas* **2013**, *42*, 1251–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Lisman, T.; Porte, R.J. Activation and regulation of hemostasis in acute liver failure and acute pancreatitis. *Semin. Thromb. Hemost.* **2010**, *36*, 437–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Radenkovic, D.; Bajec, D.; Ivancevic, N.; Milic, N.; Bumbasirevic, V.; Jeremic, V.; Djukic, V.; Stefanovic, B.; Stefanovic, B.; Milosevic-Zbutega, G.; et al. D-dimer in acute pancreatitis: A new approach for an early assessment of organ failure. *Pancreas* **2009**, *38*, 655–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Wan, J.; Yang, X.; He, W.; Zhu, Y.; Zhu, Y.; Zeng, H.; Liu, P.; Xia, L.; Lu, N. Serum D-dimer levels at admission for prediction of outcomes in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol.* **2019**, *19*, 67. [[CrossRef](#)]
188. Ou, X.; Cheng, Z.; Liu, T.; Tang, Z.; Huang, W.; Szatmary, P.; Zheng, S.; Sutton, R.; Toh, C.H.; Zhang, N.; et al. Circulating Histone Levels Reflect Disease Severity in Animal Models of Acute Pancreatitis. *Pancreas* **2015**, *44*, 1089–1095. [[CrossRef](#)]
189. Liu, T.; Huang, W.; Szatmary, P.; Abrams, S.T.; Alhamdi, Y.; Lin, Z.; Greenhalf, W.; Wang, G.; Sutton, R.; Toh, C.H. Accuracy of circulating histones in predicting persistent organ failure and mortality in patients with acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **2017**, *104*, 1215–1225. [[CrossRef](#)]
190. Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C.T.; Semeraro, F.; Taylor, F.B.; Esmon, N.L.; Lupu, F.; Esmon, C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1318–1321. [[CrossRef](#)]
191. Kang, R.; Lotze, M.T.; Zeh, H.J.; Billiar, T.R.; Tang, D. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis. *Mol. Med.* **2014**, *20*, 466–477. [[CrossRef](#)]
192. Biberici Keskin, E.; Ince, A.T.; Sumbul Gultepe, B.; Koker, I.H.; Senturk, H. The relationship between serum histon levels and the severity of acute pancreatitis. *Turk. J. Gastroenterol.* **2019**, *30*, 807–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Liu, J.; Wang, G.; Liu, Y.; Huang, L.; Xu, X.; Wang, J. Effects of Somatostatin Combined with Pantoprazole on Serum C-Reactive Protein and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Severe Acute Pancreatitis. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **2019**, *29*, 683–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Zhu, H.H.; Jiang, L.L. Serum inter-cellular adhesion molecule 1 is an early marker of diagnosis and prediction of severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 2554–2560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

195. Petricoin, E.F.; Zoon, K.C.; Kohn, E.C.; Barrett, J.C.; Liotta, L.A. Clinical proteomics: Translating benchside promise into bedside reality. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 683–695. [[CrossRef](#)]
196. Papachristou, G.I.; Malehorn, D.E.; Lamb, J.; Slivka, A.; Bigbee, W.L.; Whitcomb, D.C. Serum proteomic patterns as a predictor of severity in acute pancreatitis. *Pancreatology* **2007**, *7*, 317–324. [[CrossRef](#)]
197. Fetaud, V.; Frossard, J.L.; Farina, A.; Pastor, C.M.; Buhler, L.; Dumonceau, J.M.; Hadengue, A.; Hochstrasser, D.F.; Lescuyer, P. Proteomic profiling in an animal model of acute pancreatitis. *Proteomics* **2008**, *8*, 3621–3631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Sandstrom, A.; Andersson, R.; Segersvard, R.; Lohr, M.; Borrebaeck, C.A.; Wingren, C. Serum proteome profiling of pancreatitis using recombinant antibody microarrays reveals disease-associated biomarker signatures. *Proteom. Clin. Appl.* **2012**, *6*, 486–496. [[CrossRef](#)]
199. Garcia-Hernandez, V.; Sanchez-Bernal, C.; Sarmiento, N.; Viana, R.A.; Ferreira, L.; Perez, N.; Calvo, J.J.; Sanchez-Yague, J. Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal+mitochondrial fractions from rat pancreas: Implications for cerulein-induced acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 1058–1067. [[CrossRef](#)]
200. Ma, C.; Tian, B.; Wang, J.; Yang, G.-J.; Pan, C.-S.; Lu, J.-P. Metabolic characteristics of acute necrotizing pancreatitis and chronic pancreatitis. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *6*, 57–62. [[CrossRef](#)]
201. Xiao, H.; Huang, J.-h.; Zhang, X.-w.; Ahmed, R.; Xie, Q.-l.; Li, B.; Zhu, Y.-m.; Cai, X.; Peng, Q.-h.; Qin, Y.-h. Identification of potential diagnostic biomarkers of acute pancreatitis by serum metabolomic profiles. *Pancreatology* **2017**, *17*, 543–549. [[CrossRef](#)]
202. van Brunschot, S.; van Grinsven, J.; van Santvoort, H.C.; Bakker, O.J.; Besselink, M.G.; Boermeester, M.A.; Bollen, T.L.; Bosscha, K.; Bouwense, S.A.; Bruno, M.J.; et al. Endoscopic or surgical step-up approach for infected necrotising pancreatitis: A multicentre randomised trial. *Lancet* **2018**, *391*, 51–58. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Artigo III

International Journal of  
*Molecular Sciences*

Article

**Evaluation of Prognostic Factors of Severity in Acute Biliary Pancreatitis**

Pedro Silva-Vaz <sup>1,2,3,4,\*</sup> , Ana Margarida Abrantes <sup>5,6,7,8</sup>, Sara Morgado-Nunes <sup>4,9</sup> ,  
Miguel Castelo-Branco <sup>1,3,4</sup>, António Gouveia <sup>2,3,4</sup>, Maria Filomena Botelho <sup>5,6,7,8</sup>   
and José Guilherme Tralhão <sup>5,6,7,8,10</sup>

<sup>1</sup> Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior (CICS-UBI), 6200-506 Covilhã, Portugal; mcbranco@fcsaude.ubi.pt

<sup>2</sup> General Surgery Department, Hospital Amato Lusitano, Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, 6000-085 Castelo Branco, Portugal; agouveia@ulscb.min-saude.pt

<sup>3</sup> Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>4</sup> Clinical Academic Centre of Beiras, CACB, 6200-506 Covilhã, Portugal; sara@ipcb.pt

<sup>5</sup> Biophysics Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; mabrantes@fmed.uc.pt (A.M.A.); mfbotelho@fmed.uc.pt (M.F.B.); jglrt@hotmail.com (J.G.T.)

<sup>6</sup> Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) Area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

<sup>7</sup> CNC.IBILI Consortium/Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

<sup>8</sup> Clinical Academic Center of Coimbra, CACC, 3004-561 Coimbra, Portugal

<sup>9</sup> Polytechnic Institute of Castelo Branco, Escola Superior de Gestão, 6000-084 Castelo Branco, Portugal

<sup>10</sup> Surgery Department, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), University Hospital, Faculty of Medicine, 3000-075 Coimbra, Portugal

\* Correspondence: pedro.silvavaz@gmail.com; Tel.: +351-966-498-337

Received: 15 May 2020; Accepted: 15 June 2020; Published: 16 June 2020



**Abstract:** Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disorder of the pancreas that, when classified as severe, is associated with high morbidity and mortality. Promptly identifying the severity of AP is of extreme importance for improving clinical outcomes. The aim of this study was to compare the prognostic value of serological biomarkers, ratios, and multifactorial scores in patients with acute biliary pancreatitis and to identify the best predictors. In this observational and prospective study, the biomarkers, ratios and multifactorial scores were evaluated on admission and at 48 h of the symptom onset. On admission, regarding the AP severity, the white blood count (WBC) and neutrophil–lymphocyte ratio (NLR), and regarding the mortality, the WBC and the modified Marshall score (MMS) showed the best predictive values. At 48 h, regarding the AP severity, the hepcidin, NLR, systemic inflammatory response index (SIRI) and MMS and regarding the mortality, the NLR, hepcidin and the bedside index for severity in AP (BISAP) score, showed the best predictive values. The present study enabled the identification, for the first time, of SIRI as a new prognostic tool for AP severity, and validated hepcidin and the NLR as better prognostic markers than C-reactive protein (CRP) at 48 h of symptom onset.

**Keywords:** acute biliary pancreatitis; inflammation; prognostic; severity; hepcidin; systemic inflammatory response index

**1. Introduction**

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disorder of the pancreas with a multifactorial pathogenesis, in which enzyme activation plays a central role in local pancreatic damage, causing



systemic and peripancreatic tissue involvement [1]. In Europe, the incidence ranges from 4.6 to 100 per 100 000 population [2]. Gallstones and alcohol misuse are the main etiologies of AP [2,3]. In the Mediterranean and other southern countries, including Portugal, gallstones is the dominant etiology, with ratios for gallstones:alcohol often more than 5:1 and sometimes more than 10:1 [2]. The overall mortality rate is between 2% and 5% [4,5], but in its severe form it may reach 30% to 50% [6–8]. Several studies have shown that the first 48 h after the symptom onset is very important to identify those patients at risk of developing complications or death. This period is also important to outline an appropriate approach based on fluid resuscitation, pain control and nutritional support. Therefore, it is important to implement, as soon as possible, close monitoring or admission in an intensive care unit and to recognize patients who may require referral to other centers [9]. Nevertheless, none of the current biomarkers are consistently accurate, play a definitive role or have widespread applicable value. Actually, early identification is based on multifactorial scores as Ranson, acute physiology and chronic health evaluation (APACHE-II), bedside index for severity in AP (BISAP), systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and modified Marshall score (MMS) and several biochemical markers such C-reactive protein (CRP), white blood count (WBC), neutrophils and procalcitonin (PCT)—however all are associated with several limitations [7,10]. Therefore, the early identification of patients at risk of developing severe AP remains a great challenge.

Hepcidin is a circulating peptide hormone that regulates iron concentration in the plasma. The hepcidin levels increase during inflammation, primarily as a result of increased interleukin-6 (IL-6) [11,12]. When AP is present, IL-6 is one of the most important markers in predicting the severity of AP [13]. Previous studies have shown, that hepcidin is synthesized in the liver, kidney, heart, brain and muscles of the skeleton and also by the pancreas [14,15]. Arabul et al. [16] first correlated hepcidin serum levels with the prognosis of AP.

Systemic inflammation markers can be direct or combined, being based on routine, inexpensive and available laboratory tests. Those most described are the neutrophil–lymphocyte ratio (NLR), and the platelet–lymphocyte ratio (PLR). Related to the NLR, the elevation of this ratio during the first 48 h of admission is significantly associated with severe AP, being superior to the total WBC [17]. The PLR has been described as a tool that allows the evaluation of the systemic inflammatory response [18].

The systemic inflammatory response index (SIRI) is a combined marker of systemic inflammation, exclusively used to assess prognosis and therapeutic response in various cancers [19]. SIRI, described for the study of cancer-related inflammation [19], is based on peripheral neutrophil, monocyte and lymphocyte [20]. This is the first study, to our knowledge, that assesses this ratio in a non-malignant inflammatory situation and in acute biliary pancreatitis.

The goal of this study was to evaluate the risk prognostic value of hepcidin, NLR, PLR, SIRI, PCT and BISAP, SIRS and MMS at the early phase of acute biliary pancreatitis.

## 2. Results

### 2.1. Demographic, Clinical and Biochemical Characteristics of Patients

A total of 117 patients with AP were evaluated at recruitment. After applying the exclusion criteria, a total of 75 patients with acute biliary pancreatitis were included in this study. Of them, 47 patients were classified as mild, 15 as moderately severe and 13 as severe AP. The baseline characteristics of these patients are summarized in Table 1. The overall mean age of patients with acute biliary pancreatitis was 72 (24–96) years and the female to male ratio was 1.34:1 (43/32). The comorbidities of the patients with AP included cardiovascular diseases, chronic renal diseases and diabetes. The total mortality rate was 6.7% (5/75). Demographic and clinical characteristics of the patients who died with acute biliary pancreatitis are shown in Table S1. There was no statistical significance between the different severity groups related to age, gender, body mass index (BMI) and Charlson index (Table 1).

**Table 1.** Baseline characteristics of the patients with acute biliary pancreatitis in the different severity groups.

Variable	Total (n = 75)	Mild AP (n = 47)	Moderately Severe AP (n = 15)	Severe AP (n = 13)	p
Age (years)	72 ± 17.4	70 ± 18.7	73 ± 14.1	74 ± 17.1	NS
Female sex	57.3%	55.3%	66.7%	53.8%	NS
BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>	18.6%	19.1%	20.0%	15.4%	NS
Charlson Index	3 (2–4)	3 (1–4)	3 (2–4)	3 (2–4)	NS
Hospital stay (days)	8 (6–12)	7 (6–9)	11 (7–15)	18 (11–24)	<0.001
Mortality	5 (6.7%)	0	0	5 (38.4%)	NA
<b>Admission</b>					
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	13.99 ± 4.89	13.03 ± 4.46	12.53 ± 4.76	18.29 ± 4.08	0.001
Neutrophil (10 <sup>3</sup> /μL)	11.88 ± 4.74	10.71 ± 4.38	10.79 ± 4.39	16.37 ± 3.55	<0.001
Lymphocyte (10 <sup>3</sup> /μL)	1.31 ± 0.91	1.49 ± 1.07	1.04 ± 0.51	1.01 ± 0.52	NS
NLR	13.15 ± 8.50	11.42 ± 8.72	12.36 ± 6.19	18.94 ± 7.86	0.003
PLR	229.11 ± 141.3	215.60 ± 142.5	232.90 ± 122.9	313.73 ± 140.9	NS
SIRI	8.75 ± 8.78	8.84 ± 10.42	6.98 ± 6.30	10.24 ± 5.08	NS
CRP (mg/mL)	59.99 ± 97.66	45.12 ± 77.37	44.50 ± 63.43	118.76 ± 152.31	NS
PCT (ng/mL)	3.41 ± 6.69	2.33 ± 5.58	4.18 ± 5.46	5.77 ± 10.00	0.013
Hepcidin (ng/mL)*	71.21 ± 78.21	52.93 ± 74.43	85.83 ± 57.90	109.76 ± 94.64	0.026
BISAP	1 (1–2)	1 (1–2)	1 (1–3)	2 (1–3)	<0.01
SIRS	1 (0–2)	1 (0–1)	1 (0–2)	1 (1–2)	<0.05
MMS	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–1)	1 (0–3)	<0.01
<b>48 h</b>					
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	10.08 ± 4.84	8.60 ± 3.52	11.38 ± 6.69	15.07 ± 2.71	0.001
Neutrophil (10 <sup>3</sup> /μL)	8.02 ± 4.89	6.10 ± 3.61	9.37 ± 6.08	13.41 ± 2.63	<0.001
Lymphocyte (10 <sup>3</sup> /μL)	1.37 ± 0.58	1.39 ± 0.52	1.25 ± 0.77	0.85 ± 0.36	0.002
NLR	8.26 ± 6.80	5.37 ± 4.27	8.87 ± 4.87	18.06 ± 7.55	<0.001
PLR	174.65 ± 98.19	158.13 ± 83.9	176.43 ± 75.9	232.62 ± 146.7	0.029
SIRI	4.69 ± 4.69	2.94 ± 2.74	5.21 ± 5.39	10.44 ± 5.08	<0.001
CRP (mg/mL)	161.68 ± 134.48	103.9 ± 102.66	200.73 ± 117.49	325.61 ± 106.58	<0.001
PCT (ng/mL)	3.39 ± 5.85	2.01 ± 3.99	4.27 ± 7.03	7.36 ± 8.27	0.001
Hepcidin (ng/mL) *	92.44 ± 102.91	44.96 ± 39.62	74.42 ± 50.78	286.42 ± 81.74	<0.001
BISAP	1 (1–3)	1 (1–2)	2 (1–3)	4 (4–5)	<0.001
SIRS	0 (0–2)	0 (0–1)	0 (0–1)	3 (2–3)	<0.001
MMS	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–2)	3 (2–4)	<0.001

Results in mean ± SD, median (p25–p75) or n(%); \* For the evaluation of hepcidin 66 serum samples were analyzed: mild AP (n = 41), moderately severe (n = 13) and severe (n = 12). AP: acute pancreatitis; BISAP: bedside index for severity in acute pancreatitis; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; MMS: modified Marshall score; NLR: neutrophil–lymphocyte ratio; NA: not applicable; NS: not significant; PCT: procalcitonin; PLR: platelet–lymphocyte ratio; SIRI: systemic inflammatory response index; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; WBC: white blood count; p: statistical significance for the comparison between the mild, moderately severe and severe categories.

## 2.2. Laboratory Parameters and Score Systems on Admission

Regarding the studied laboratory parameters, the WBC ( $p < 0.001$ ), NLR ( $p < 0.01$ ), and hepcidin ( $p < 0.01$ ) levels of the severe AP group were significantly increased when compared to the mild AP group. No difference was found between the mild and moderately severe AP for WBC, NLR, PCT and hepcidin. The WBC ( $p < 0.05$ ) and NLR ( $p < 0.05$ ) showed significant difference between the moderately severe and severe AP. Regarding the score systems, the statistical significance was verified between the different groups of AP severity for BISAP, SIRS and MMS ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) (Table 1). The BISAP score showed significant difference between the mild and severe AP ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Laboratory Parameters and Score Systems at 48 h after Symptom Onset

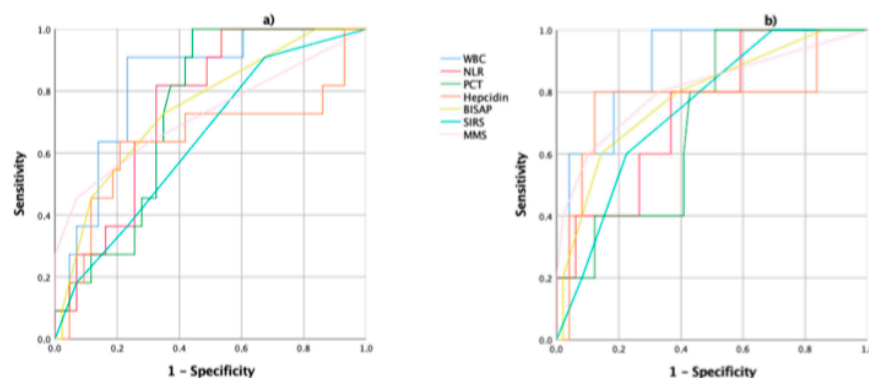
When the biochemical markers were evaluated it was found that the WBC, NLR, SIRI, PLR, PCT, CRP and hepcidin levels of the severe AP group were significantly increased compared to the mild AP group ( $p < 0.001$  for NLR, SIRI, CRP and hepcidin;  $p < 0.01$  for PLR and PCT). Significant difference was found between the mild and moderately severe AP for the WBC, SIRI and CRP ( $p < 0.01$ ) and for the NLR ( $p < 0.05$ ). When the moderately severe and severe AP groups were compared, only hepcidin ( $p < 0.001$ ) and SIRI ( $p < 0.05$ ) showed a significant difference between. When the scores were analyzed, the statistical significance between the different groups of AP severity for BISAP, SIRS and MMS was found ( $p < 0.001$ ) (Table 1). The BISAP, SIRS and MMS showed a significant difference between the mild and severe AP ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.01$ , respectively) and between the moderately severe and severe AP ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

### 2.4. Prognostic Accuracy of Laboratory and Score Systems

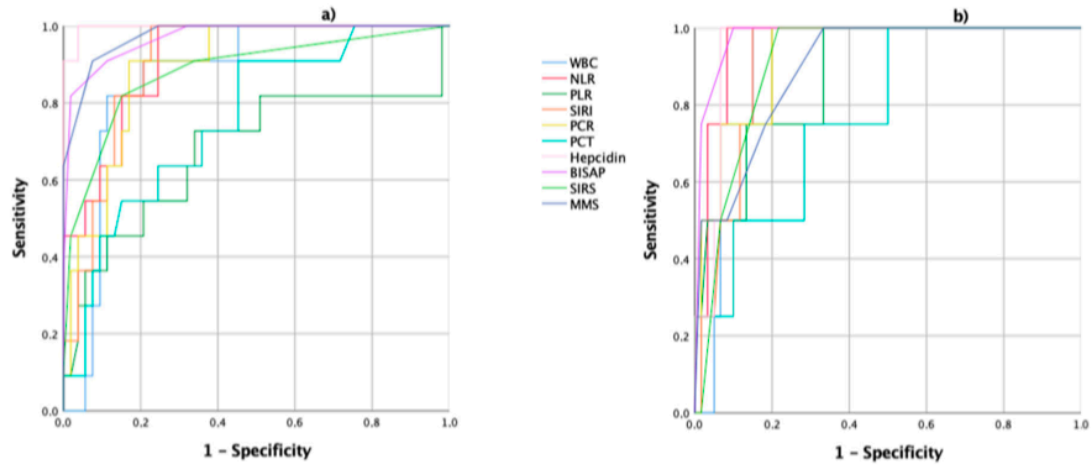
Regarding the prediction of the severity and mortality of acute biliary pancreatitis, the area under the receiver operating characteristics (ROC AUC) curves for the biochemical parameters and score systems studied are shown in Figures 1 and 2 and in Tables 2–5.

On admission, the evaluation of the ROC AUC for the severity of acute biliary pancreatitis showed that the WBC, the NLR and BISAP scores had higher areas (Table 2 and Figure 1a). For a WBC level of  $14.88 \times 10^3/\mu\text{L}$ , the sensitivity, specificity, the positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) were of 91%, 75%, 44% and 98%, respectively. For a cutoff of 14.64, the NLR showed a sensitivity of 82%, a specificity of 67%, PPV of 36% and NPV of 96% (Table 3). When the mortality was analyzed, the WBC and the MMS showed higher areas (Table 2 and Figure 1b).

When analyzing the ROC AUC for the acute biliary pancreatitis severity, after 48 h of symptom onset, it was found that hepcidin, NLR, SIRI, BISAP and MMS had the highest areas (Table 4 and Figure 2a). Using 154.7 ng/mL as the cutoff point, hepcidin serum concentration at 48 h could readily predict severe acute biliary pancreatitis with a sensitivity of 100%, specificity of 96%, PPV of 86%, NPV of 100% and accuracy of 97%. The sensitivity, NPV and accuracy (97%) for hepcidin were higher than the other commonly used parameters. For a SIRI cutoff of 7.14, the sensitivity, specificity, PPV and NPV was of 82%, 87%, 53% and 96%, respectively (Table 5). When the predictive value for AP mortality was analyzed, the highest ROC AUC were observed for BISAP, NLR and hepcidin (Table 4 and Figure 2b). The hepcidin serum concentration for AP mortality showed the highest accuracy (92%) when compared with the other evaluated parameters.



**Figure 1.** Receiver operating characteristics (ROC) curves of the WBC: white blood count; NLR: neutrophil/lymphocyte ratio; PCT: procalcitonin; hepcidin; BISAP: bedside index of severity in acute pancreatitis; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; and the MMS: modified Marshall score, on admission; (a) the ROC curves for the prediction of acute biliary pancreatitis severity; (b) the ROC curves for the prediction of acute biliary pancreatitis mortality.



**Figure 2.** ROC curves of WBC: white blood count; NLR: neutrophil/lymphocyte ratio, SIRI: systemic inflammatory response index; PLR: platelet/lymphocyte ratio; CRP: C-reactive protein; PCT: procalcitonin; hepcidin; BISAP: bedside index of severity in acute pancreatitis; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; and the MMS: modified Marshall score, at 48 h of symptom onset; (a) the ROC curves for the prediction of acute biliary pancreatitis severity; (b) the ROC curves for the prediction of acute biliary pancreatitis mortality.

**Table 2.** Area under the receiver operating characteristics curve for the prediction of severe disease and mortality on admission.

Outcome to Predict	Predictor	AUC (95% CI)
Severe disease	WBC	0.829 (0.707–0.951)
	NLR	0.751 (0.615–0.886)
	PCT	0.735 (0.601–0.869)
	Hepcidin	0.641 (0.423–0.859)
	BISAP	0.747 (0.588–0.907)
	SIRS	0.643 (0.469–0.817)
	MMS	0.723 (0.528–0.918)
Mortality	WBC	0.886 (0.767–1)
	NLR	0.743 (0.538–0.948)
	PCT	0.708 (0.512–0.904)
	Hepcidin	0.776 (0.499–1)
	BISAP	0.786 (0.571–1)
	SIRS	0.747 (0.555–0.939)
MMS	0.810 (0.572–1)	

AUC: area under the receiver operating characteristics curve; CI: confidence intervals; MMS: modified Marshall score; NLR: neutrophil/lymphocyte ratio; PCT: procalcitonin; BISAP: bedside index of severity in acute pancreatitis; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; WBC: white blood count.

**Table 3.** Prognostic accuracy of the biochemical markers and the score systems of acute biliary pancreatitis severity on admission.

Variable	Se	Sp	PPV	NPV
WBC $\geq 14.88 \times 10^3/\mu\text{L}$	91	75	44	98
NLR $\geq 14.64$	82	67	36	96
PCT $\geq 0.58 \text{ ng/mL}$	73	65	29	93
Hepcidin $\geq 72.8 \text{ ng/mL}$	64	79	47	90
BISAP $\geq 3$	45	89	46	89
SIRS $\geq 2$	36	75	24	85
MMS $\geq 2$	45	94	56	88

Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV/NPV: positive/negative predictive values; MMS: modified Marshall score; NLR: neutrophil/lymphocyte ratio; PCT: procalcitonin; BISAP: bedside index of severity in acute pancreatitis; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; WBC: white blood count.

**Table 4.** Area under the receiver operating characteristics curve for the prediction of severe disease and mortality at 48 h.

Outcome to Predict	Predictor	AUC (95% CI)
Severe disease	WBC	0.868 (0.771–0.965)
	NLR	0.914 (0.841–0.988)
	PLR	0.675 (0.464–0.886)
	SIRI	0.906 (0.833–0.979)
	CRP	0.892 (0.807–0.977)
	PCT	0.757 (0.609–0.906)
	Hepcidin	0.997 (0.987–1)
	BISAP	0.970 (0.826–1)
	SIRS	0.883 (0.758–1)
	MMS	0.975 (0.939–1)
Mortality	WBC	0.917 (0.843–0.990)
	NLR	0.963 (0.914–1)
	PLR	0.877 (0.736–1)
	SIRI	0.915 (0.836–0.993)
	CRP	0.929 (0.839–1)
	PCT	0.779 (0.579–1)
	Hepcidin	0.954 (0.901–1)
	BISAP	0.979 (0.943–1)
	SIRS	0.908 (0.824–0.992)
	MMS	0.898 (0.780–1)

AUC: area under the receiver operating characteristics curve; CI: confidence intervals; NLR: neutrophil/lymphocyte ratio; PLR: platelet/lymphocyte ratio; SIRI: systemic inflammatory response index; CRP: C-reactive protein; MMS: modified Marshall score; PCT: procalcitonin; BISAP: bedside index of severity in acute pancreatitis; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; WBC: white blood count.

**Table 5.** Prognostic accuracy of the biochemical markers and the score systems of acute biliary pancreatitis severity at 48 h.

Variable	Se	Sp	PPV	NPV
WBC $\geq 12.09 \times 10^3/\mu\text{L}$	91	80	43	82
NLR $\geq 10.89$	82	85	45	93
SIRI $\geq 7.14$	82	87	53	96
PLR $\geq 187.80$	73	66	34	93
CRP $\geq 150 \text{ mg/mL}$	100	60	34	100
PCT $\geq 2.83 \text{ ng/mL}$	64	76	38	91
Hepcidin $\geq 154.7 \text{ ng/mL}$	100	96	86	100
BISAP $\geq 3$	91	89	55	96
SIRS $\geq 2$	82	85	48	94
MMS $\geq 2$	91	93	65	97

Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV/NPV: positive/negative predictive values; NLR: neutrophil/lymphocyte ratio; SIRI: systemic inflammatory response index; PLR: platelet/lymphocyte ratio; CRP: C-reactive protein; MMS: modified Marshall score; PCT: procalcitonin; BISAP: bedside index of severity in acute pancreatitis; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; WBC: white blood count.

On admission, it was possible to verify that 17 patients presented values of hepcidin  $\geq 72.8 \text{ ng/mL}$ , with 29% in patients with mild AP, 24% with moderately severe AP and 47% with severe AP. At 48 h, it was found that 14 patients had hepcidin values  $\geq 154.7 \text{ ng/mL}$ , with 7% in patients with mild AP, 7% with moderately severe AP and 86% in patients with severe AP.

When hepcidin was compared with other biomarkers and the multifactorial scores studied, it was found that at admission, this biomarker correlated with the PCT at admission ( $r = 0.352, p < 0.01$ ), PCT at 48 h ( $r = 0.287, p < 0.05$ ), SIRI at 48 h ( $r = 0.313, p < 0.05$ ) and CRP at 48 h ( $r = 0.493, p < 0.001$ ), MMS at admission ( $p < 0.05$ ) and MMS at 48 h ( $p < 0.05$ ). Regarding hepcidin at 48 h, there was a correlation between the NLR ( $r = 0.654, p < 0.001$ ), CRP ( $r = 0.703, p < 0.001$ ) and SIRI ( $r = 0.589, p < 0.001$ ), all at 48 h. When analyzing multifactorial scores, hepcidin at 48 h correlates with all of the studied scores. When assessing the correlation of hepcidin with revised Atlanta classification (RAC), it was observed that on admission, hepcidin correlates, in mild AP, with WBC at admission ( $r = 0.366, p < 0.05$ ) and PCT at admission ( $r = 0.461, p < 0.01$ ), with no other correlations in both moderately severe and severe AP. At 48 h, hepcidin correlates, in mild AP, with SIRI at 48 h ( $r = 0.346, p < 0.05$ ) and CRP at 48 h ( $r = 0.536, p < 0.001$ ) and in moderately severe AP, with NLR at 48 h ( $r = 0.690, p < 0.01$ ), with no correlations with other biomarkers in severe AP.

Regarding SIRI at 48 h, there was a correlation with CRP ( $r = 0.685, p < 0.001$ ) and with hepcidin ( $r = 0.589, p < 0.001$ ) both at 48 h. When assessing RAC, the correlation was verified with CRP in mild AP ( $r = 0.535, p < 0.001$ ) and in moderately severe AP ( $r = 0.611, p < 0.01$ ).

### 3. Discussion

AP, an inflammatory disorder of the pancreas, is responsible for a large number of hospital admissions associated with a great economic cost [3,21]. In this sense, the stratification of the severity of AP is crucial, not only for obtaining good clinical outcomes, but also for cost effectiveness. The RAC defines three degrees of severity: mild, moderately severe and severe AP [6]. The severity of AP can be predicted based upon clinical, laboratory, and radiologic risk factors, several severity score systems, and biomarkers. Some of these can be performed on admission to assist in the triage of patients, while others can only be obtained during the first 48 to 72 h or later [7]. The ideal predictor should be rapid, reproducible, inexpensive, minimally invasive and highly accurate [22]. The identification of patients with severe AP, in the first 48 h, through a biomarker, is crucial for an effective approach and good outcomes. Unfortunately, none has to date proven to be a good accurate predictor of the clinical course of AP.

Gallstones are the main cause of AP and result from the impaction of migratory gallstones in the ampulla, causing obstruction and inflammation, being responsible for about 40% of all cases of pancreatitis. Alcohol is the second leading cause of acute pancreatitis, accounting for approximately 20% to 35% of AP cases. Hypertriglyceridemia is the third most common cause of pancreatitis and is responsible for more than 15% of the cases. Post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis (PEP) accounts for 1% to 5% of AP cases [23,24].

The population included in this study was exclusively composed of patients with acute biliary pancreatitis, considered in the Mediterranean countries, the most common etiology [2]. Since the gallstones etiology is the most frequent cause of AP in these countries, and although differences are recognized between the various etiologies of AP, there are few studies aimed at this subtype of patient population [25,26].

Etiology can be an important determinant of AP severity. Kamal et al. [23] in their retrospective study found that acute biliary pancreatitis is a more severe disease compared with PEP and alcoholic pancreatitis. Acute biliary pancreatitis is more associated with an extended length of stay, pseudocyst formation, necrosis, organ failure and mortality. One justification may be the association with recurrent episodes of pancreatitis, without definitive treatment, since the repetition of episodes may increase the pancreatic damage with an increased incidence of necrosis. This study showed that SIRS at 48 h is a good predictor of severity and mortality in patients with gallstone etiology. In turn, hypertriglyceridemia AP is associated with local complications and organ failure. Several authors confirmed that this etiology was associated with more AP severity compared to biliary and alcoholic etiology [24].

Although only 10% to 20% of the patients develop severe AP, this degree of severity is associated with a high mortality rate, justified by the progression of the acute inflammatory response to SIRS and/or multiorgan failure [27]. However, the individual response to pancreatic injury is highly variable, and in most cases, unpredictable [28].

According to Párniczky et al. [5], in their prospective and national multicenter study, in a total of 600 adult patient diagnosed with AP, the majority of the patients were mild (61.2%), 30% were moderately severe and 8.8% were severe, when classified with the RAC. These authors suggest that age is a risk factor for the AP severity. In the present study, which included only patients with acute biliary pancreatitis, 62.7% of the patients had mild, 20% had moderately severe and 17.3% had severe AP. The patients had a median age of 72, with the following distribution: mild AP (70 years), moderately severe AP (73 years) and severe AP (74 years), higher than the population studied by Párniczky, which may justify the high rate of severe AP.

For all these reasons, it is urgent to analyze the existing serological markers and multifactorial severity scores and to evaluate and revalidate the markers that can provide an early identification of the patients at risk of developing severe AP and in this subgroup of patients with gallstones etiology. This early assessment of the severity of acute biliary pancreatitis becomes crucial, especially in the first 48 h, since this period is considered important to define the therapeutic approach.

There are currently several biomarkers and multifactorial scoring systems used for the early prediction of severe AP, namely, Ranson, APACHE II, CRP, BISAP and PCT. Miko et al. [29] in their meta-analysis, identified the AUC for several biomarkers and scoring systems to predict the AP severity and mortality. For severity, the AUC for BISAP was 0.79 and for CRP was 0.73; for mortality, the AUC for BISAP was 0.87 and for CRP was 0.73. Párniczky et al. [5], in their prospective and multicenter study, evaluated several biomarkers of prognosis. They observed that the  $WBC \geq 23 \times 10^3/\mu L$  was associated with severe AP, with significant differences between the three degrees of severity, and the same was verified for CRP ( $\geq 200$  mg/L) and PCT ( $\geq 10$  U/L), however, to this last biomarker, the average levels did not differ significantly for the severity of AP.

The originality of the present clinical study is based on the identification and validation of serological markers or calculated ratios for severity and mortality in patients with acute biliary pancreatitis, allowing the identification of which patients are at a higher risk of developing severe AP or the persistence of organ failure and death.

The patients included in this study underwent abdominal ultrasound (US) to confirm the biliary etiology. Patients with etiological doubt after the US underwent endoscopic ultrasonography to exclude microlithiasis and the characterization of the biliary tree.

In this study, several serological biomarkers, ratios and multifactorial scores were evaluated. The ratios were calculated using some of the biomarkers analyzed. The periods evaluated in this study were the admission, considered the ideal time for the assessment of the prognosis and the most used in the majority of studies, and the 48 h of symptom onset, in order to analyze the predictive power of the different markers at the time when persistent organ failure was defined. With this study, it was possible to confirm that serological markers in individual use can be used as early tools for the prognosis of AP severity in the first 48 h after admission. Therefore, on admission, when the severity was assessed, it was found that the serological markers that had the greatest predictive power were the WBC (0.829) and the NLR (0.751). When mortality was assessed, it was found that the WBC (0.886) had the best predictive value. When severity was assessed at 48 h after the onset of symptoms, it was found that hepcidin (0.997), the NLR (0.914) and SIRI (0.906) had the greatest predictive values. In turn, when mortality was analyzed, the biomarkers that showed the greatest predictive power were the NLR (0.963), hepcidin (0.954), CRP (0.929) and SIRI (0.915).

The serum WBC level is elevated as a physiological response to several inflammatory reactions, such as AP. Several studies report it as a good predictive tool for AP severity. However, there are studies that show different and sometimes contradictory results. Serum WBC levels vary with physiological and pathological conditions, including hydration status, stress, and pregnancy [30], that could be responsible for the differences found. Ünal et al. [31] evaluated the role of WBC as a prognostic tool and described for a cutoff of  $15.20 \times 10^3/\mu\text{L}$ , a sensitivity, specificity of 67% and 88%, respectively. Mayer et al. [32] concluded that WBC provided a good discrimination between the mild and severe AP. They also verified that this difference was apparent on the admission day. In turn, Farkas et al. [8] verified that on admission and within 24 h from the onset of symptoms, WBC cannot predict the AP severity and mortality. This is a high-quality study that shows the duality of the results obtained. In the present study, on admission, WBC showed to be a good discriminator between mild and severe AP ( $p < 0.001$ ) and between moderately severe and severe AP ( $p < 0.05$ ). For a cutoff  $\geq 14.88 \times 10^3/\mu\text{L}$ , the sensitivity, specificity and accuracy were 91%, 75% and 79%, respectively. These results are very important since they show a high predictive value for the AP severity at admission. When this marker was evaluated at 48 h of symptom onset, for a cutoff  $\geq 12.09 \times 10^3/\mu\text{L}$ , the sensitivity, specificity and accuracy were of 91%, 80% and 78%, respectively. This study shows that WBC can be an early predictive marker of the severity of acute biliary pancreatitis, easily accessible in clinical practice.

However, several studies have been published focusing on the ratios calculated from hemogram values, which better reflect the systemic inflammatory response, like the NLR, SIRI and the PLR [33].

The NLR allows the measurement of the systemic inflammatory response, since it represents the contrast of two complementary immune pathways, however contradictory. Neutrophils are the main cells responsible for the non-specific inflammatory response and the main initiator of the tissue destructive cascade. In turn, the lymphocyte immune response occurs later and its main function is to mediate and resolve the pre-existing non-specific inflammatory process [34]. Azab et al. [17] assessed the predictive value of the NLR on admission to the ICU and described, for a cutoff value of 4.7, that the sensitivity and specificity were 85.2% and 47.7%, respectively. When applying the cutoff described by these authors in the present study, on admission, a sensitivity and specificity of 100% and 30%, was found, respectively. These authors also demonstrated that the NLR is more stable than serum WBC levels. Gülen et al. [35] demonstrated an increase in the NLR of 9.99 in the patients who died within the first 24 h. In the present study, on admission, for a cutoff value of 14.64, the sensitivity, specificity and accuracy were of 82%, 67% and 73%, while at 48 h, for a cutoff value of 10.89, the sensitivity, specificity and accuracy were of 82%, 85% and 80%, respectively. Kaplan et al. [36] described the cutoff value of 13.64 with 73% sensitivity and 82.7% specificity for the disease severity. This cutoff is similar to that described in the present study on admission. When the predictive value for the mortality of acute



biliary pancreatitis was assessed, it was found that, at 48 h after the symptom onset, the NLR had the highest AUC. Like Azab et al., most NLR studies to date have divided the study populations into tertiles. In the present study, the intention was to determine the optimal NLR cutoff value, and this decision may justify the different cutoff value obtained [34]. When analyzing the studies that address the prognostic value of the NLR in AP, there are variations in the cutoff values described [35–39]. Further studies are needed to confirm the role of the NLR as a prognostic tool in pancreatitis, as well as the optimal cutoff value.

SIRI was first described for the study of cancer-related inflammation [40]. This index lists the levels of neutrophils, monocytes and lymphocytes in the blood count of cancer patients and their prognosis, as well as in assessing the response to chemotherapy (QT) regimens [40–42]. SIRI was defined in the following formula:  $SIRI = N \times M/L$ , where  $N$  represents neutrophils,  $M$ —monocytes and  $L$ —lymphocytes [40]. The optimal cutoff described for the analysis of the response to QT was 2.3 [41]. In the present study, SIRI showed significant changes in the assessment of the acute biliary pancreatitis severity and mortality at 48 h. In assessing the severity, the cutoff  $\geq 7.14$ , showed a sensitivity, specificity, PPV, VPN and accuracy of 82%, 87%, 53%, 96% and 85%, respectively. When the mortality was assessed, it was found that the SIRI had an AUC of 0.915. When this biomarker was correlated at 48 h after the onset of symptoms, with the other parameters, a strong correlation with CRP and a moderate correlation with hepcidin were verified, both at 48 h. In the RAC evaluation and in relation to CRP, SIRI showed a moderate correlation in mild AP, and a strong correlation in moderately severe AP. To our knowledge, this is the first study to assess the applicability of this index in a benign inflammatory process such as AP, hence the cutoff value is different from that described by the malignant pathology studies. Although it is a biomarker with a predictive value only at 48 h, it can be considered an excellent tool using values obtained in the blood count, which are easily applicable in clinical practice.

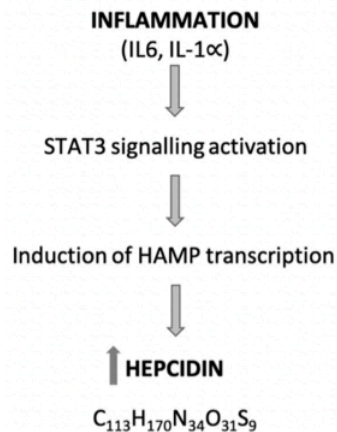
The PLR has been described as a tool that allows for the measurement of the systemic inflammatory response [43,44]. Platelets play an important role in hemostasis and in the immune-inflammatory response in the context of inflammatory processes [45]. Lymphocytes are involved in the adaptive immune response [45]. In the present study, contrary to what was verified by some authors [45], a change with statistical significance was found for the assessment of acute biliary pancreatitis severity at 48 h. For a cutoff  $\geq 187.80$ , the sensitivity, specificity and accuracy were 73%, 66% and 70%, respectively. Zhou et al. [33] verified, for a cutoff  $\geq 169.29$ , an AUC of 0.621. The authors also confirmed that the PLR was an inflammatory biomarker and the role of platelet as a crucial link between inflammation and microvascular dysfunction. In the present study, the PLR was also considered as a tool with a predictive value for AP severity, although with less accuracy than the NLR and SIRI.

PCT, a 116 amino acid propeptide of calcitonin, was found to appear in high concentration during inflammation and sepsis [46,47]. This biomarker is released by hepatocytes, peripheral monocytes, and G-cells of the thyroid gland. An increased PCT level has been observed in severe AP, pancreatitis necrosis and organ failure [10]. Brunkhorst et al. [48] found a significant difference between the patients with acute biliary pancreatitis and other etiologies. Mofidi et al. [49], in their systematic review, using a cutoff  $\geq 0.5$  ng/mL, found a sensitivity of 73% and a specificity of 87% for the severity of AP, with an overall AUC of 0.88. In the present study, on admission, for a PCT cutoff  $\geq 0.58$  ng/mL, the test had a 93% NPV for identifying severe AP patients, with a sensitivity of 73% and a specificity of 65%, and an overall AUC of 0.735. At 48 h of symptom onset, for a cutoff  $\geq 2.83$  ng/mL, this marker is able to predict severe AP with an NPV, sensitivity and specificity of 91%, 64% and 76%, respectively. These results overlap with those described in the majority of studies confirming the applicability of this marker in predicting the severity of acute biliary pancreatitis.

CRP is an acute-phase protein, described as a predictive tool for AP prognosis and mortality [7]. This acute phase reactant has been widely used as an independent predictor of AP severity and mortality, especially at 48 h after hospital admission [50]. The accepted cutoff value is  $\geq 150$  mg/dL at 48 h, with a sensitivity, specificity, PPV and an NPV of 80%, 75%, 67% and 86%, respectively [51].

However, as observed in other biomarkers, several studies have shown different results. Farkas et al. [8] found that on admission, CRP shows poor predictive accuracy for AP severity and mortality, but within 24 h from the onset of pain, elevated CRP levels can be used as inclusion criteria in research studies. In the present study, CRP was evaluated as a predictive tool for AP severity at 48 h. Analyzing the cutoff  $\geq 150$  mg/dL, the sensitivity, specificity, NPV and accuracy found were of 100%, 60%, 100% and 67%, respectively. These study results confirm the predictive power of this marker at 48 h. However, CRP is a marker with a low specificity despite having been widely studied as a prognostic tool in AP [50]. However, it is not AP-specific and its levels should be interpreted according to the patient's clinical condition [52]. This biomarker presents itself as a useful, easily accessible and low-cost tool with applicability in clinical practice.

Hepcidin was first described by Krause et al. [53], termed as liver-expressed antimicrobial peptide (LEAP-1) with antimicrobial activity. In 2001, Park et al. [54] identified it in urine and renamed it as hepcidin. Hepcidin is a peptide hormone with 25 amino acids, responsible for the regulation of the hemostasis of iron. The hepcidin gene (hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)) is located on chromosome 19 [55]. The main source of the synthesis of hepcidin is the liver. Extra-hepatic production of hepcidin was described in the heart, kidney, retina, monocytes and macrophages, alveolar cells, adipocytes, pancreatic  $\beta$ -cells and bile [16,55,56]. The hepcidin levels increase during inflammation, primarily as a result of increased IL-6 and IL-1 [11,57] levels by activating the signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) signaling to hepcidin gene promoter (Figure 3).



**Figure 3.** The generation of hepcidin in the inflammatory process. STAT3 activation requires the presence of SAMD4 because its absence prevents STAT3-mediated hepcidin gene expression [58]. This process can be framed within the inflammatory process of AP. IL: interleukin; STAT3: signal transducer and activator of transcription-3; HAMP: hepcidin antimicrobial peptide.

Since hepcidin is also synthesized in the pancreas and biliary system, we can state that it predicts the specific and non-specific inflammation of AP, making it a unique biomarker. In the present study, this marker was evaluated on admission, showing a poor predictive power (0.641). However, at 48 h after the symptom onset, it was shown to be the most potent predictive marker for AP severity. For a cut-off  $\geq 154.7$  ng/mL, the sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy observed were of 100%, 96%, 86%, 100% and 97%, respectively. Interestingly, when hepcidin on admission was correlated with the biomarkers studied, there was a moderate correlation with CRP at 48 h, while at 48 h there was a strong correlation with CRP and NLR, both at 48 h. When the RAC was assessed, a moderate correlation was verified in mild AP with PCT and PCR at 48 h and a moderate correlation with NLR at 48 h in moderately severe AP. These results can be explained due to some characteristics of hepcidin. Hepcidin is synthesized from the pancreas and released into the systemic circulation via pancreatic beta cells. Another non-exclusive hypothesis could be that the liver, the main source of hepcidin production,

better translates the abdominal inflammation related to acute pancreatitis, mediated by IL-1 and IL-6. At 48 h, extra pancreatic hepcidin can be synthesized and released in the bile duct, raising the levels of this marker at a later stage and justifying the greater predictive value in this period of time. Hecpidin, once produced in the pancreas, can be interpreted as a specific marker of pancreatic inflammation. However, hepcidin is a non-specific inflammatory reagent, such as CRP, WBC and PCT.

Both on admission and at 48 h, there was an increase in the serum hepcidin levels in severe AP (47% at admission and 86% at 48 h). This role in the assessment of the prognosis of AP will allow for the early individualized approach to each patient's clinical status, closer monitoring and possible transfer to the ICU, improving the morbidity and mortality associated with this pathology. The identification of these patients will also allow the evolution of the monitorization of local and systemic complications associated with AP. In the presence of mild AP patients, the laparoscopic cholecystectomy could be performed, during the same hospitalization, in order to eliminate the etiological factor and prevent the recurrence of the pancreatic inflammatory process. The results verified in this study have shown that hepcidin is a better prognostic marker than CRP, being a possible prognostic tool to be adopted in clinical practice.

Regarding the multifactorial prognostic scores, the BISAP score, the SIRS score and the modified Marshall score were evaluated, due to their potential use in a clinical setting and the studies published with their assessment on the prognosis of AP severity.

The BISAP was proposed as a simple-to-use score with clinical data easily available on admission and in the first 24/48 h [59]. Several studies have validated the performance of the BISAP score as a predictive tool for AP severity [60,61]. In its validation, it presented an AUC of 0.83 for mortality (95% CI: 0.8–0.85) [62]. In the present study, when the predictive value for severity was evaluated, the BISAP score presented an AUC of 0.747 at admission and 0.970 at 48 h. For a cutoff  $\geq 3$ , the sensitivity, specificity and accuracy on admission and at 48 h were 45% and 91%, 89% and 89%, 81% and 85%, respectively. When the predictive value for mortality was analyzed, the BISAP score presented an AUC of 0.786 at admission and 0.979 at 48 h. The BISAP score showed the best predictive value, for mortality, at 48 h. Due to its ease of use and calculation, it should be recommended in clinical practice, to evaluate the prognostic of acute biliary pancreatitis, either on admission or at 48 h.

The SIRS score is simple and widely used in a clinical setting, being an important tool for assessing systemic disorders [63]. If SIRS ( $\geq 2$ ) persists for more than 48 h after admission, there is an increased risk of developing multiorgan dysfunction, as determined by the MMS [6]. In the present study, both the SIRS score and the MMS had a significant predictive value at 48 h. For a common cutoff of  $\geq 2$ , they showed a sensitivity, specificity and an accuracy of 82% and 91%, 85% and 93% and 81% and 89%, respectively. They are useful tools for assessing AP severity at 48 h, since it is in this period of time that persistent organ failure is defined.

In summary, this clinical study enabled the identification, for the first time, of SIRI as a new prognostic tool for AP severity, and validated hepcidin and the NLR as better prognostic markers than the CRP at 48 h of symptom onset.

This study, like other studies evaluating the research on AP prognostic biomarkers, has as its main limitation being a single institution study with a small sample size, particularly in moderately severe and severe groups of patients. Further studies are needed to confirm the future applicability of these clinical markers as prognostic factors for acute biliary pancreatitis severity, as they may allow for the early identification of multiorgan failure and acute biliary pancreatitis-associated necrosis and anticipate therapeutic measures that may reduce the risk of associated morbidity and mortality due to this acute pancreatic inflammatory process.

#### 4. Materials and Methods

From November 2015 to March 2017, 75 patients with acute biliary pancreatitis were admitted to the Department of General Surgery of the Hospital Amato Lusitano of Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, University Teaching Hospital. The protocol was approved by the local ethic committee

(reference number 10294/15) and was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient.

#### 4.1. Study Population

Adults ( $\geq 18$  years) patients with acute biliary pancreatitis were prospectively recruited. AP was defined according to the revised Atlanta classification (RAC). At least two of the following three features should be present: (1) abdominal pain consistent with AP; (2) serum lipase activity (or amylase activity) at least three times greater than the upper limit of normal value; (3) and characteristic findings of AP on contrast-enhanced computed tomography (CECT) and less commonly on magnetic resonance imaging (MRI) or on transabdominal ultrasonography (US) [6]. Local and systemic complications were defined according to the RAC [6], and systemic inflammatory response (SIRS) was defined according to the established criteria. The severity of AP was defined according to the RAC: mild (no organ or no local or systemic complications), moderately severe (organ failure that was resolved within 48 h and/or the presence of local or systemic complications without persistent organ failure) and severe (presence of persistent organ failure).

#### 4.2. Inclusion and Exclusion Criteria

All patients with acute biliary pancreatitis were included. Patients with other causes of AP except biliary, recurrent AP, chronic pancreatitis, pancreatitis due to malignancy, pregnant patients, patients with a time from the onset of disease to presentation in the emergency room greater than 24 h and patients being hospitalized for more than 24 h at the time of recruitment, were excluded from the study. For an etiological confirmation of AP, the patients underwent US with the identification of gallstones or microlithiasis. Patients with etiological doubt after US underwent endoscopic ultrasonography to exclude microlithiasis.

#### 4.3. Analysis of Biomarkers

Blood samples were collected from each patient on admission and after 48 h of the symptom onset, drawn into 5 mL heparin-treated tubes and centrifuged for 10 min at  $1500\times g$ . The serum was then collected and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Seventy-five serum samples were analyzed and categorized into mild AP ( $n = 47$ ), moderately severe ( $n = 15$ ) and severe AP ( $n = 13$ ) on admission and at 48 h after symptom onset. Lipase (U/L), amylase (U/L), CRP (mg/dL), PCT (ng/dL), WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ ), neutrophil ( $10^3/\mu\text{L}$ ), lymphocyte ( $10^3/\mu\text{L}$ ), monocyte ( $10^3/\mu\text{L}$ ) and platelet were analyzed in accordance with certified standard analysis at the Department of Clinical Pathology, Unidade Local de Saúde de Castelo Branco. The neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios were calculated. For the calculation of SIRI, the formula  $\text{SIRI} = N \times M \div L$  was used. For the evaluation of hepcidin, 9 patients were excluded due to failure in collecting blood samples. Thus, on admission and after 48 h after the symptom onset, 66 serum samples were analyzed: mild AP ( $n = 41$ ), moderately severe ( $n = 13$ ) and severe ( $n = 12$ ) for the evaluation of hepcidin. Serum levels of hepcidin were determined in batch using a commercial Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA kit (DRG Instrument, GmbH, Margurg, Germany) according to the manufacturer's protocol.

#### 4.4. Score Systems Determination

The BISAP score was described in 2008 and consists of a simple method for the early assessment of the mortality risk in patients with AP. It evaluates 5 parameters: BUN, mental status, SIRS, age and pleural effusion. The cutoff used to assess the mortality risk and severity of AP was  $\geq 3$ . In the present study, this score was assessed at admission and at 48 h after symptom onset.

SIRS is a simple score and is widely used in a clinical setting. It evaluates 4 parameters: temperature, respiratory rate, pulse and WBC. This score is defined by the presence of  $\geq 2$  of the described parameters. In the present study, this score was assessed at admission and at 48 h after symptom onset.

The MMS allows for the assessment of multiorgan failure in AP. Organ failure includes one or more of the following parameters: cardiovascular, respiratory and kidney failure. Multiorgan failure is present to a cutoff of  $\geq 2$ . In the present study, this score was assessed at admission and at 48 h after symptom onset.

#### 4.5. Statistical Methods

Results are expressed in mean (SD), median (Q1, Q3) or  $n$  (%). Normality was assessed by means of the Shapiro–Wilk test. Regarding the quantitative variables, the central tendency was compared using the Student  $t$  or Mann–Whitney test (2 categories) or ANOVA or Kruskal–Wallis ( $>2$  categories). In the case of qualitative variables, the associations were verified using the chi-square test ( $\chi^2$ ), with Fisher’s correction when necessary. Receiver operating characteristics (ROC) curves were calculated for assessing the prognostic accuracy and for determining the best cutoff points. A  $p$  value less than 0.05 indicated statistical significance. Statistical analyses were performed using SPSS 25.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/12/4300/s1>.

**Author Contributions:** P.S.-V. recruited and followed the patients; P.S.-V. and A.M.A. designed the concept of research and the experiments; P.S.-V. wrote the manuscript draft; P.S.-V., A.M.A. and S.M.-N. analyzed the data; M.C.-B., A.G., M.F.B. and J.G.T. critically revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** We thank Mariana Martins, Head of the Department of Clinical Pathology at the Hospital Amato Lusitano, Unidade Local de Saúde de Castelo Branco and her collaborators for all the support in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

AP	Acute pancreatitis
APACHE	Acute physiology and chronic health evaluation
AUC	Area under the curve
BISAP	Bedside index of severity in acute pancreatitis
BMI	Body mass index
CECT	Contrast-enhanced computed tomography
CI	Confidence interval
CRP	C-reactive protein
HAMP	Hepcidin antimicrobial peptide
IL	Interleukin
L	Lymphocyte
LEAP	Liver-expressed antimicrobial peptide
M	Monocyte
MMS	Modified Marshall score
MRI	Magnetic resonance imaging
N	Neutrophil
NLR	Neutrophil–lymphocyte ratio
NPV	Negative predictive value
NS	Not significant
PCT	Procalcitonin
PEP	Post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis
PLR	Platelet–lymphocyte ratio
PPV	Positive predictive value
QT	Chemotherapy

RAC	Revised Atlanta classification
ROC	Received operating characteristics
SD	Standard deviation
Se	Sensibility
SIRI	Systemic inflammatory response index
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Sp	Specificity
STAT	Signal transducer and activator of transcription
US	Ultrasound
WBC	White blood count

## References

- Ruiz-Rebollo, M.L.; Muñoz-Moreno, M.F.; Mayo-Iscar, A.; Udaondo-Cascante, M.A.; Nistal, R.B. Statin intake can decrease acute pancreatitis severity. *Pancreatology* **2019**, *19*, 807–812. [[CrossRef](#)]
- Roberts, S.E.; Morrison-Rees, S.; John, A.; Williams, J.G.; Brown, T.H.; Samuel, D.G. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology* **2017**, *17*, 155–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- van Dijk, S.M.; Hallensleben, N.D.; van Santvoort, H.C.; Fockens, P.; van Goor, H.; Bruno, M.J.; Besselink, M.G. Acute pancreatitis: Recent advances through randomised trials. *Gut* **2017**, *66*, 2024–2032. [[CrossRef](#)]
- García-Rayado, G.; Varela-Moreiras, G.; Lanás, Á.; Ferrández, Á.; Balza-Lareu, N.; Cervera, J.I.; Bodenlle-Bello, M.P.; Argüelles-Arias, A.M.; Latorre, P.; Udaondo-Cascante, M.A.; et al. Dietary fat patterns and outcomes in acute pancreatitis in Spain. *Front. Med.* **2020**, *7*, 126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Párniczky, A.; Kui, B.; Szentesi, A.; Balázs, A.; Szűcs, Á.; Mosztbacher, D.; Czimmer, J.; Sarlós, P.; Bajor, J.; Gódi, S.; et al. Prospective, multicentre, nationwide clinical data from 600 cases of acute pancreatitis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Banks, P.A.; Bollen, T.L.; Dervenis, C.; Gooszen, H.G.; Johnson, C.D.; Sarr, M.G.; Tsiotos, G.G.; Vege, S.S. Classification of acute pancreatitis–2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* **2013**, *62*, 102–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Silva-Vaz, P.; Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhao, J.G. Multifactorial scores and biomarkers of prognosis of acute pancreatitis: Applications to research and practice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Farkas, N.; Hanák, L.; Mikó, A.; Bajor, J.; Sarlós, P.; Czimmer, J.; Vincze, Á.; Gódi, S.; Pécsi, D.; Varjú, P.; et al. A multicenter, international cohort analysis of 1435 cases to support clinical trial design in acute pancreatitis. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1092. [[CrossRef](#)]
- Zhang, X.-X.; Deng, L.-H.; Chen, W.-W.; Shi, N.; Jin, T.; Lin, Z.-Q.; Ma, Y.; Jiang, K.; Yang, X.-N.; Xia, Q. Circulating microRNA 216 as a marker for the early identification of severe acute pancreatitis. *Am. J. Med. Sci.* **2017**, *353*, 178–186. [[CrossRef](#)]
- Khanna, A.K.; Meher, S.; Prakash, S.; Tiwary, S.K.; Singh, U.; Srivastava, A.; Dixit, V. Comparison of Ranson, Glasgow, MOSS, SIRS, BISAP, APACHE-II, CTSI Scores, IL-6, CRP, and procalcitonin in predicting severity, organ failure, pancreatic necrosis, and mortality in acute pancreatitis. *HPB Surg.* **2013**, *2013*, 367581. [[CrossRef](#)]
- Wrighting, D.M.; Andrews, N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **2006**, *108*, 3204–3209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nicolas, G.; Chauvet, C.; Viatte, L.; Danan, J.L.; Bigard, X.; Devaux, I.; Beaumont, C.; Kahn, A.; Vaulont, S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 1037–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, N.; Wang, B.M.; Cai, S.; Liu, P.L. The role of serum high mobility group box 1 and interleukin-6 levels in acute pancreatitis: A meta-analysis. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 616–624. [[CrossRef](#)]
- Dudkowiak, R.; Neubauer, K.; Poniewierka, E. Hepcidin and its role in inflammatory bowel disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2013**, *22*, 585–591.
- Kulaksiz, H.; Fein, E.; Redecker, P.; Stremmel, W.; Adler, G.; Cetin, Y. Pancreatic b-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J. Endocrinol.* **2008**, *197*, 241–250. [[CrossRef](#)]

16. Arabul, M.; Celik, M.; Aslan, O.; Torun, S.; Beyazit, Y.; Alper, E.; Kandemir, A.; Unsal, B. Hepcidin as a predictor of disease severity in acute pancreatitis: A single center prospective study. *Hepatogastroenterology* **2013**, *60*, 595–600. [[CrossRef](#)]
17. Azab, B.; Jaglall, N.; Atallah, J.P.; Lamet, A.; Raja-Surya, V.; Farah, B.; Lesser, M.; Widmann, W.D. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of adverse outcomes of acute pancreatitis. *Pancreatology* **2011**, *11*, 445–452. [[CrossRef](#)]
18. Djordjevic, D.; Rondovic, G.; Surbatovic, M.; Stanojevic, I.; Udovicic, I.; Andjelic, T.; Zeba, S.; Milosavljevic, S.; Stankovic, N.; Abazovic, D.; et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, monocyte-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and mean platelet volume-to-platelet count ratio as biomarkers in critically ill and injured patients: Which ratio to choose to predict outcome and nature of bacteremia? *Mediators Inflamm.* **2018**, *2018*, 3758068. [[CrossRef](#)]
19. Qi, Q.; Zhuang, L.; Shen, Y.; Geng, Y.; Yu, S.; Chen, H.; Liu, L.; Meng, Z.; Wang, P.; Chen, Z. A novel systemic inflammation response index (SIRI) for predicting the survival of patients with pancreatic cancer after chemotherapy. *Cancer* **2016**, *122*, 2158–2167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kamposioras, K.; Razaq, M.; Ahmad, U.; Damyanova, I.; Papaxoinis, G. Systemic inflammatory response index (SIRI) predicts poor survival in pancreatic cancer patients treated with FOLFIRINOX. *Ann. Oncol.* **2019**, *30* (Suppl. 4), iv45. [[CrossRef](#)]
21. Silva-Vaz, P.; Abrantes, A.M.; Castelo-Branco, M.; Gouveia, A.; Botelho, M.F.; Tralhão, J.G. Murine Models of Acute Pancreatitis: A Critical Appraisal of Clinical Relevance. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Windsor, J.A. Search for prognostic markers for acute pancreatitis. *Lancet* **2000**, *355*, 1924–1925. [[CrossRef](#)]
23. Kamal, A.; Akshintala, V.S.; Kamal, M.M.; El Zein, M.; Besharati, S.; Kumbhari, V.; Ngamruengphong, S.; Shin, E.J.; Singh, V.K.; Kalloo, A.N.; et al. Does etiology of pancreatitis matter? Differences in outcomes among patients with post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography, acute biliary, and alcoholic pancreatitis. *Pancreas* **2019**, *48*, 574–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mosztbacher, D.; Hanák, L.; Farkas, N.; Szentesi, A.; Mikó, A.; Bajor, J.; Sarlós, P.; Czimmer, J.; Vincze, R.; Hegyi, P.J.; et al. Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A prospective, multicenter, international cohort analysis of 716 acute pancreatitis cases. *Pancreatology* **2020**, *20*, 608–616. [[CrossRef](#)]
25. Zhao, X.; Chen, D.Z.; Lang, R.; Jin, Z.K.; Fan, H.; Wu, T.M.; Li, X.L.; He, Q. Enhanced recovery in the management of mild gallstone pancreatitis: A prospective cohort study. *Surg. Today* **2013**, *43*, 643–647. [[CrossRef](#)]
26. Gungor, B.; Caglayan, K.; Polat, C.; Seren, D.; Erzurumlu, K.; Malazgirt, Z. The predictivity of serum biochemical markers in acute biliary pancreatitis. *ISRN Gastroenterol.* **2011**, *2011*, 279607. [[CrossRef](#)]
27. Kolber, W.; Kuśnierz-Cabala, B.; Dumnicka, P.; Maraj, M.; Mazur-Laskowska, M.; Pędziwiatr, M.; Ceranowicz, P. Serum Urokinase-type plasminogen activator receptor does not outperform c-reactive protein and procalcitonin as an early marker of severity of acute pancreatitis. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 305. [[CrossRef](#)]
28. Wu, B.U.; Batech, M.; Quezada, M.; Lew, D.; Fujikawa, K.; Kung, J.; Jamil, L.H.; Chen, W.; Afghani, E.; Reicher, S.; et al. Dynamic measurement of disease activity in acute pancreatitis: The pancreatitis activity scoring system. *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 1144–1152. [[CrossRef](#)]
29. Mikó, A.; Vigh, É.; Mátrai, P.; Soós, A.; Garami, A.; Balaskó, M.; Czákó, L.; Mosdósi, B.; Sarlós, P.; Erőss, B.; et al. Computed tomography severity index vs. other indices in the prediction of severity and mortality in acute pancreatitis: A predictive accuracy meta-analysis. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1002. [[CrossRef](#)]
30. Garrey, W.; Bryan, W.R. Variations in white blood cell counts. *Physiol. Rev.* **1935**, *15*, 597–638. [[CrossRef](#)]
31. Unal, Y.; Barlas, A.M. Role of increased immature granulocyte percentage in the early prediction of acute necrotizing pancreatitis. *Ulus. Travma Acil. Cerrahi. Derg.* **2019**, *25*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Mayer, A.; McMahon, M.; Bowen, M.; Cooper, E. C reactive protein: An aid to assessment and monitoring of acute pancreatitis. *J. Clin. Pathol.* **1984**, *37*, 207–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhou, H.; Mei, X.; He, X.; Lan, T.; Guo, S. Severity stratification and prognostic prediction of patients with acute pancreatitis at early phase: A retrospective study. *Medicine* **2019**, *98*, e15275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Suppiah, A.; Malde, D.; Arab, T.; Hamed, M.; Allgar, V.; Smith, A.M.; Morris-Stiff, G. The prognostic value of the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in acute pancreatitis: Identification of an optimal NLR. *J. Gastrointest. Surg.* **2013**, *17*, 675–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Gulen, B.; Sonmez, E.; Yaylaci, S.; Serinken, M.; Eken, C.; Dur, A.; Turkdogan, F.T.; Sogut, O. Effect of harmless acute pancreatitis score, red cell distribution width and neutrophil/lymphocyte ratio on the mortality of patients with nontraumatic acute pancreatitis at the emergency department. *World J. Emerg. Med.* **2015**, *6*, 29–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kaplan, M.; Ates, I.; Oztas, E.; Yuksel, M.; Akpinar, M.Y.; Coskun, O.; Kayacetin, E. A new marker to determine prognosis of acute pancreatitis: PLR and NLR combination. *J. Med. Biochem.* **2018**, *37*, 21–30. [[CrossRef](#)]
37. Tanoglu, A.; Duzenli, T. Neutrophil-to-lymphocyte ratio alone may not be a true indicator of the severity of acute pancreatitis. *Turk. J. Gastroenterol.* **2019**, *30*, 937. [[CrossRef](#)]
38. Petrescu, G.S.; Georgescu, I.; Petrescu, A.M.; Radulescu, D.; Petrescu, M.O.; Patrascu, S. Balthazar score and neutrophil-lymphocytes ratio in acute pancreatitis. *Curr. Health Sci. J.* **2019**, *45*, 316–320. [[CrossRef](#)]
39. Park, H.S.; In, S.G.; Yoon, H.J.; Lee, W.J.; Woo, S.H.; Kim, D. Predictive values of neutrophil-lymphocyte ratio as an early indicator for severe acute pancreatitis in the emergency department patients. *J. Lab. Physicians* **2019**, *11*, 259–264. [[CrossRef](#)]
40. Gu, L.; Ma, X.; Wang, L.; Li, H.; Chen, L.; Li, X.; Zhang, Y.; Xie, Y.; Zhang, X. Prognostic value of a systemic inflammatory response index in metastatic renal cell carcinoma and construction of a predictive model. *Oncotarget* **2017**, *8*, 52094–52103. [[CrossRef](#)]
41. Pacheco-Barcia, V.; Mondejar Solis, R.; France, T.; Asselah, J.; Donnay, O.; Zogopoulos, G.; Bouganis, N.; Guo, K.; Rogado, J.; Martin, E.; et al. A systemic inflammation response index (SIRI) correlates with survival and predicts oncological outcome for mFOLFIRINOX therapy in metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology* **2019**, *20*, 254–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chen, L.; Kong, X.; Wang, Z.; Wang, X.; Fang, Y.; Wang, J. Pretreatment systemic inflammation response index in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy as a useful prognostic indicator. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 1543–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Miglani, R.K.; Bhateja, N.; Bhat, R.S.; Kumar, K.V. Diagnostic role of platelet lymphocyte ratio (PLR) in pancreatic head masses. *Indian J. Surg.* **2013**, *75*, 4–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cho, S.K.; Jung, S.; Lee, K.J.; Kim, J.W. Neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio can predict the severity of gallstone pancreatitis. *BMC Gastroenterol.* **2018**, *18*, 18. [[CrossRef](#)]
45. Ilhan, M.; Ilhan, G.; Gok, A.F.; Bademler, S.; Verit Atmaca, F.; Ertekin, C. Evaluation of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width-platelet ratio as early predictor of acute pancreatitis in pregnancy. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *29*, 1476–1480. [[CrossRef](#)]
46. Rau, B.; Steinbach, G.; Gansauge, F.; Mayer, J.M.; Grunert, A.; Beger, H.G. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* **1997**, *41*, 832–840. [[CrossRef](#)]
47. Kylanpaa-Back, M.L.; Takala, A.; Kempainen, E.; Puolakkainen, P.; Haapiainen, R.; Repo, H. Procalcitonin strip test in the early detection of severe acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **2001**, *88*, 222–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Brunkhorst, F.M.; Eberhard, O.K.; Brunkhorst, R. Early identification of biliary pancreatitis with procalcitonin. *Am. J. Gastroenterol.* **1998**, *93*, 1191–1192. [[CrossRef](#)]
49. Mofidi, R.; Suttie, S.A.; Patil, P.V.; Ogston, S.; Parks, R.W. The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: Systematic review. *Surgery* **2009**, *146*, 72–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Cardoso, F.S.; Ricardo, L.B.; Oliveira, A.M.; Canena, J.M.; Horta, D.V.; Papoila, A.L.; Deus, J.R. C-reactive protein prognostic accuracy in acute pancreatitis: Timing of measurement and cutoff points. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *25*, 784–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Stirling, A.D.; Moran, N.R.; Kelly, M.E.; Ridgway, P.F.; Conlon, K.C. The predictive value of C-reactive protein (CRP) in acute pancreatitis—is interval change in CRP an additional indicator of severity? *HPB* **2017**, *19*, 874–880. [[CrossRef](#)]
52. Rau, B.; Steinbach, G.; Baumgart, K.; Gansauge, F.; Grunert, A.; Beger, H.G. Serum amyloid A versus C-reactive protein in acute pancreatitis: Clinical value of an alternative acute-phase reactant. *Crit. Care Med.* **2000**, *28*, 736–742. [[CrossRef](#)]
53. Krause, A.; Neitz, S.; Mägert, H.-J.; Schulz, A.; Forssmann, W.-G.; Schulz-Knappe, P.; Adermann, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **2000**, *480*, 147–150. [[CrossRef](#)]



54. Park, C.H.; Valore, E.V.; Waring, A.J.; Ganz, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7806–7810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kali, A.; Charles, M.V.P.; Seetharam, R.S.K. Hepcidin-A novel biomarker with changing trends. *Pharmacogn. Rev.* **2015**, *9*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Arnold, J.; Sangwaiya, A.; Manglam, V.; Geoghegan, F.; Thursz, M.; Busbridge, M. Presence of hepcidin-25 in biological fluids: Bile, ascitic and pleural fluids. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 2129. [[CrossRef](#)]
57. Babitt, J.L.; Huang, F.W.; Wrighting, D.M.; Xia, Y.; Sidis, Y.; Samad, T.A.; Campagna, J.A.; Chung, R.T.; Schneyer, A.L.; Woolf, C.J. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 531. [[CrossRef](#)]
58. Wang, R.-H.; Li, C.; Xu, X.; Zheng, Y.; Xiao, C.; Zervas, P.; Cooperman, S.; Eckhaus, M.; Rouault, T.; Mishra, L. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 399–409. [[CrossRef](#)]
59. Wu, B.U.; Johannes, R.S.; Sun, X.; Tabak, Y.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: A large population-based study. *Gut* **2008**, *57*, 1698–1703. [[CrossRef](#)]
60. Yang, Y.X.; Li, L. Evaluating the Ability of the Bedside Index for Severity of Acute Pancreatitis Score to Predict Severe Acute Pancreatitis: A Meta-Analysis. *Med. Princ. Pract.* **2016**, *25*, 137–142. [[CrossRef](#)]
61. Hagjer, S.; Kumar, N. Evaluation of the BISAP scoring system in prognostication of acute pancreatitis—A prospective observational study. *Int. J. Surg.* **2018**, *54*, 76–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Singh, V.K.; Wu, B.U.; Bollen, T.L.; Repas, K.; Maurer, R.; Johannes, R.S.; Mortele, K.J.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. A prospective evaluation of the bedside index for severity in acute pancreatitis score in assessing mortality and intermediate markers of severity in acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jain, S.; Midha, S.; Mahapatra, S.J.; Gupta, S.; Sharma, M.K.; Nayak, B.; Jacob, T.G.; Shalimar; Garg, P.K. Interleukin-6 significantly improves predictive value of systemic inflammatory response syndrome for predicting severe acute pancreatitis. *Pancreatology* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).