

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

**Estudo do papel do receptor de quimiocina CCR2 no modelo experimental
de lesão pulmonar associada à pancreatite aguda induzida pela
administração de etanol e ácido palmitoleico**

Lucas Kraemer Rocha

Belo Horizonte

2017

Lucas Kraemer Rocha

Estudo do papel do receptor de quimiocina CCR2 no modelo experimental de lesão pulmonar associada à pancreatite aguda induzida pela administração de etanol e ácido palmitoleico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia)

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profº. Dr. Remo de Castro Russo

Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar (Dep. Fisiologia e Biofísica, UFMG)

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2017

**"ESTUDO DO PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR2
NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR
ASSOCIADA À PANCREATITE AGUDA INDUZIDA PELA
ADMINISTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO PALMITOLEICO"**

LUCAS KRAEMER ROCHA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 07 de junho de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. MARCUS VINICIUS MELO DE ANDRADE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. MAURO MARTINS TEIXEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. REMO DE CASTRO RUSSO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 07 de junho de 2017

Dedico este trabalho à minha filha Lara, minha linda flor, fonte de amor, carinho e inspiração na arte de viver.

Agradecimentos

À toda minha família pelo apoio, compreensão e amor. Especialmente meus pais Márcio e Ângela, pelo sacrifício que fizeram na vida para que eu tivesse o melhor ensino possível, e à minha filha Lara, por esse grande amor que me faz querer ser sempre uma pessoa melhor.

À Barbara Zaidan, admirável pessoa e companheira que sempre está presente na minha vida com grande amor, me apoiando e dando o carinho que preciso. Além da grande sua contribuição na escrita deste trabalho.

Aos meus amigos, pelos bons momentos de boa música, eterna amizade, sucesso e rock and roll. Especialmente ao Matheus Mattos, por todo o companheirismo e ajuda, tanto na minha vida profissional quanto na minha vida pessoal. Agradecimento especial, também, à Juliana Guerra, minha irmã de coração que estará sempre presente na minha vida sempre que eu precisar.

Ao meu orientador Remo Russo, pela oportunidade, confiança e sabedoria indispensável na minha carreira como pesquisador.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar por toda a ajuda e parceria na realização deste projeto, e pela amizade nesses anos.

À equipe do LEEFFAG, especialmente o professor Pedro Marcos Gomes Soares e as alunas Cecília e Talita, pela grande colaboração com o modelo experimental de pancreatite aguda.

Aos amigos do grupo IMUNOFAR, especialmente o professor Mauro por sempre disponibilizar tudo que precisamos para fazer ciência de qualidade.

Ao programa de pós-graduação em fisiologia e farmacologia e todos os professores que o integram.

Às agências financiadoras, CAPES e CNPq.

Muito obrigado!

“Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth”

Jules Verne, A Journey to the Center of the Earth

Resumo

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória do pâncreas, que pode afetar órgãos remotos como o pulmão. Representa um importante problema de saúde pública, considerada taxa de morbidade e mortalidade, patogênese ainda não esclarecida e sem tratamento específico. Na forma grave da doença, a inflamação sistêmica exacerbada pode causar SDRA, responsável por cerca de 20% da mortalidade. Considerando que macrófagos são células inflamatórias importantes no desenvolvimento de lesão pulmonar associada à pancreatite aguda, e que nenhum modelo experimental é completamente satisfatório até o momento, os objetivos do nosso trabalho foram padronizar um modelo de pancreatite aguda mais adequado para o estudo da lesão pulmonar remota e estudar o papel do receptor CCR2 nesta patogênese. Nosso modelo experimental foi induzido pela administração *i.p.* de ácido palmitoleico (POA) (200 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg) em camundongos C57Bl/6. Após 24 horas observamos aumento de lipase e amilase, infiltrado inflamatório no pâncreas e piora no escore histopatológico no órgão dos animais WT. Por outro lado, animais CCR2^{-/-} foram protegidos da letalidade, que pode ser relacionada com a redução do recrutamento de macrófagos, níveis de amilase e lipase normais, além da histologia preservada. Encontramos, também, níveis elevados de CCL2 no soro dos animais e um maior nível de CXCL1 nos animais WT comparando com CCR2^{-/-}. No pulmão, a ausência do CCR2 foi capaz de reduzir o influxo de neutrófilos e macrófagos para as vias aéreas, e exsudação de proteínas. No entanto, observamos um aumento no número de linfócitos no BAL comparado com animais WT. No tecido pulmonar, encontramos um acúmulo de neutrófilos nos animais WT e CCR2, mas acúmulo de macrófagos apenas nos animais CCR2^{-/-}. A avaliação da mecânica pulmonar mostrou que nosso modelo experimental induz perda de função pulmonar e a ausência do CCR2 evitou essa piora em todos os parâmetros. Então, nossos dados sugerem que nosso modelo experimental se mostrou interessante para estudo da pancreatite aguda com lesão pulmonar associada, e que o receptor CCR2 participa da regulação do processo inflamatório local e sistêmico.

Palavras-chave: pancreatite aguda, inflamação, lesão pulmonar, CCR2, macrófago.

Abstract

Acute pancreatitis is an acute inflammatory disease of the exocrine pancreas that can involve remote organs including lung. It represents an important public health problem, with considerable morbidity and mortality, without specific treatment and pathogenesis remains obscure. Severe acute pancreatitis can lead to systemic inflammation and ARDS, responsible about 20% of mortality. Considering macrophages are important inflammatory cells in development of lung injury associated acute pancreatitis, and none of the experimental models are completely satisfactory until now, the aims of this work were to establish an acute pancreatitis model more adequately for the investigation of remote lung injury and to study the role of CCR2 in this pathogenesis. Our experimental model was induced by POA (200 mg/kg) and ethanol (1,8 g/kg) administration in C57Bl/6 mice. 24 hours later administration, we can observe amylase and lipase increase, cell recruitment in pancreas and worse of histopathological score in organ. In contrast, CCR2^{-/-} animals were protected from lethality that can be related with decrease of macrophage infiltrate, normal levels of amylase and lipase, beyond of normal histopathological score in pancreas. Our results further showed high levels of CCL2 in serum of mice and increase of CXCL1 levels in WT compared with control and CCR2^{-/-} mice. In lung, absence of CCR2 could reduce the neutrophil and macrophage influx to airway and protein exudation. However, we observed increased number of lymphocytes in BAL compared with WT mice. In lung tissue, we found there was a neutrophil accumulation in WT and CCR2^{-/-} mice, but macrophage accumulation only in CCR2^{-/-} mice. The pulmonary function assessment showed that our experimental model induced loss of lung function and absence of CCR2 avoids worsening of all parameters. Thus, our data suggest that our experimental model became interesting to study acute pancreatitis and associated lung injury, and CCR2 participate of local and systemic inflammatory process regulation.

Keywords: acute pancreatitis, inflammation, lung injury, CCR2, macrophage.

Lista de figuras

Figura 1: Principais mecanismos desencadeadores da pancreatite aguda.....	20
Figura 2: Vias oxidativas e não oxidativas do metabolismo do etanol.....	23
Figura 3: Diagrama ilustrativo da migração leucocitária no pulmão.....	38
Figura 4: Inflamação pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo.....	42
Figura 5: Curva de sobrevivência de diferentes doses de administração de ácido palmitoleico.....	53
Figura 6: Inflamação pancreática no modelo de pancreatite aguda induzida por POA/etanol em camundongos C57Bl/6.....	55
Figura 7: Níveis séricos de marcadores da pancreatite e de quimiocinas no modelo de pancreatite aguda induzida por POA/etanol em camundongos C57Bl/6.....	57
Figura 8: Recrutamento de leucócitos e exsudação de proteínas para as vias aéreas de camundongos C57Bl/6.....	59
Figura 9: Nível de quimiocinas, leucócitos e inflamação no pulmão de camundongos C57Bl/6.....	61
Figura 10: Mecânica pulmonar de camundongos C57Bl/6	63
Figura 11: Curva de sobrevivência da administração de POA/etanol em camundongos WT e CCR2-/-.....	64
Figura 12: Inflamação pancreática em camundongos WT e CCR2-/-.....	66
Figura 13: Níveis séricos de marcadores da pancreatite e de quimiocinas em camundongos WT e CCR2-/-.....	68
Figura 14: Recrutamento de leucócitos e exsudação de proteínas para as vias aéreas em camundongos WT e CCR2-/-.....	60
Figura 15: Níveis de quimiocinas, leucócitos e inflamação no pulmão de camundongos WT e CCR2-/-.....	72

Figura 16: Mecânica pulmonar dos camundongos WT e CCR2-/-.....74

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação da síndrome do desconforto respiratório agudo segundo a definição de Berlim, 2012.....29

Lista de abreviaturas

°C	Graus Celsius
ADH	Álcool Desidrogenase
ANOVA	Análise de Variância
BAL	Lavado Bronco Alveolar
BSA	Albumina de Soro Bovino
C5a	Fator 5a do complemento
Cchord50	Complacência quase-estática 50%
CCK	Colecistoquinina
CYP 2E1	Citocromo P450 2E1
DMSO	Dimetilsulfóxido

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima
FAEEs	Etil Ésteres de Ácidos Graxos
FRC	Capacidade Funcional Residual
GPCRs	Receptores Acoplados à Proteína G
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
IC	Capacidade Inspiratória
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular - 1
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal

KC	Químioatraente de queratinócitos
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína químioatraente de monócito - 1
min	Minutos
MIP-2	Proteína Inflamatória de Macrófago - 2
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetilglicosaminidase
NF-κB	Fator Nuclear – Kappa B
OPD	O-fenilenediamina dicloridrato
PAF	Fator de Ativação Plaquetária

PBS	Tampão Salina-Fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
POA	Ácido palmitoleico
PV	Pressão-Volume
RI	Resistência Pulmonar
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RV	Volume Residual
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SPINK 1	Inibidores Serinoproteases Tipo 1 Kazal

TLC	Capacidade Total Pulmonar
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
U	Unidade
V/V	Volume/Volume

Sumário

1	Introdução	17
	1.1 Pancreatite aguda	17
	1.1.1 O pâncreas	17
	1.1.2 Etiologia e fisiopatologia da pancreatite aguda	18
	1.1.3 O álcool e a pancreatite aguda alcoólica	21
	1.1.4 Modelos experimentais de pancreatite aguda	25
	1.2 Lesão pulmonar associada à pancreatite aguda	27
	1.2.1 O pulmão	27
	1.2.2 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	28
	1.2.3 Mediadores inflamatórios	31
2	Justificativa	43
3	Objetivos	44
	3.1 Objetivos gerais	44
	3.2 Objetivos específicos	44
4	Materiais e métodos	45
	4.1 Animais	45
	4.2 Pancreatite aguda induzida por álcool e ácido palmitoleico	45
	4.3 Análise da mecânica pulmonar	46
	4.4 Determinação de lipase e amilase séricas	47
	4.5 Lavado bronco alveolar	47
	4.6 Coleta e processamento do pulmão e pâncreas	48
	4.7 Ensaio da atividade da mieloperoxidase tecidual	49
	4.8 Ensaio da atividade da N-acetilglicosaminidase tecidual	49
	4.9 Dosagem de proteínas totais	50
	4.10 Dosagem de quimiocinas	50
	4.11 Análise histológica do pâncreas	51
	4.12 Análise estatística	51
5	Resultados	52
	5.1 Padronização do modelo experimental de pancreatite aguda	52
	5.1.1 Administração de ácido palmitotélico combinado com etanol causa letalidade nos camundongos C57Bl/6 de maneira dose-dependente	52

5.1.2 Administração de POA/etanol causa acúmulo de células inflamatórias e piora da avaliação histopatológica no pâncreas de camundongos C57Bl/6.....53

5.1.3 Administração de POA/etanol resulta em aumento dos marcadores séricos da pancreatite e de quimiocinas importantes na resposta inflamatória sistêmica em camundongos C57Bl/6.....56

5.2 Lesão pulmonar associada à pancreatite aguda experimental em camundongos C57Bl/6.....58

5.2.1 A indução da pancreatite aguda experimental causa recrutamento de leucócitos e exsudação de proteínas para as vias aéreas.....58

5.2.2 A indução da pancreatite aguda experimental causa um recrutamento de neutrófilos, aumento das quimiocinas CXCL1 e CCL2, e aumento de células inflamatórias no pulmão dos camundongos C57Bl/6.....60

5.2.3 A indução da pancreatite aguda experimental causa uma piora na mecânica pulmonar dos animais C57Bl/6.....62

5.3 Investigação da pancreatite aguda em camundongos deficiente para o receptor de quimiocinas CCR2.....64

5.3.1 Animais deficientes para o receptor CCR2 são protegidos da letalidade causada pela pancreatite aguda experimental.....64

5.3.2 Animais deficientes para o receptor CCR2 possuem redução no acúmulo de macrófagos e melhora na histopatologia do pâncreas.....64

5.3.3 Animais deficientes para o receptor CCR2 não possuem biomarcadores de pancreatite elevados e os níveis séricos de CXCL1 são reduzidos.....67

5.4 Estudo da lesão pulmonar associada à pancreatite aguda em camundongos deficientes para o receptor de quimiocina CCR2.....69

5.4.1 A indução da pancreatite aguda experimental causa uma mudança nas populações leucocitárias nas vias aéreas e redução da exsudação de proteínas nos animais deficientes para o receptor CCR2-/-.....69

5.4.2 Animais deficientes para o receptor possuem níveis reduzidos de CXCL1 e acúmulo de macrófagos no pulmão.....71

5.4.3 Animais deficientes para o receptor CCR2 são protegidos da piora da função pulmonar causada pela pancreatite aguda experimental.....73

5.5 Sumário dos resultados.....74

6 Discussão.....76

7 Conclusão.....84

8 Referências Bibliográficas.....85

1 Introdução

1.1 Pancreatite aguda

1.1.1 O pâncreas

O pâncreas adulto é uma glândula retro peritoneal transversalmente orientada, que se estende desde a concavidade em “C” do duodeno até o hilo do baço. Possui, em média, 20 cm de comprimento e pesa de 85 a 90 gramas. O pâncreas é dividido em quatro partes com base em sua vascularização adjacente: cabeça, colo, corpo e cauda. O pâncreas é um órgão complexo, lobular, com distintos componentes exócrinos e endócrinos. A porção endócrina é composta por, aproximadamente, 1 milhão de pequenos aglomerados de células, as ilhotas de Langerhans, que constituem apenas 1 a 2% do órgão e são responsáveis pela secreção de insulina, glucagon e somatostatina. A porção exócrina, que constitui de 80% a 85% do pâncreas, é composta por células acinares, que produzem as enzimas necessárias para a digestão e também por uma série de canais e ductos condutores que transportam as secreções para o duodeno. As células acinares são células epiteliais com formato piramidal, que são orientadas radialmente em torno de um lúmen central. Elas contêm grânulos de zimogênio ligados à membrana, sendo ricos em enzimas digestivas (Robbins e Cotran, 2010).

De um modo geral, o pâncreas secreta seus produtos exócrinos sob a forma de pró-enzimas inertes, tanto para prevenir a autodigestão quanto para utilizar eficientemente as enzimas na luz no duodeno. As enzimas digestivas contidas nos grânulos de zimogênio encontram-se na forma de precursores inativos (tripsinogênio, quimiotripsinogênio, proelastase, profosfolipase, calicreinogênio e procarboxipeptidase), ativando-se apenas no lúmen intestinal por hidrólise do tripsinogênio em tripsina. Além da liberação de pró-enzimas inertes, a autodigestão do tecido é impedida por outros mecanismos como: compartimentalização enzimática, inibidores de tripsina (incluindo inibidores Kazal serinoprotease tipo 1 (SPINK1)) e células acinares com relativa resistência a ação de tripsina, quimotripsina e fosfolipase A. A tripsina ativada funciona como autocatalisadora e desencadeia a ativação das pró-enzimas restantes. Se os

mecanismos inibitórios da tripsina pancreática falharem, a tripsina ativada nas células acinares leva a ativação de várias enzimas, o que pode culminar na autodigestão do pâncreas, levando à pancreatite (Norman et al., 1996; Robbins e Cotran, 2010).

1.1.2 Etiologia e fisiopatologia da pancreatite aguda

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória do pâncreas exócrino, que frequentemente envolve tecidos peripancreáticos e, posteriormente, órgãos remotos do sistema. Possui considerável taxa de morbidade e mortalidade, e não possui tratamento específico, com sua patogênese ainda não completamente esclarecida (Gukovsky et al., 2012; Pandol et al., 2007).

A incidência anual de pancreatite aguda varia entre 50 a 80 casos anuais para cada 100.000 habitantes nos Estados Unidos da América e está sujeita a variações entre populações e grupos étnicos, devido a fatores que interferem diretamente na incidência da doença, como abuso de álcool (Banks, 2007; Clancy et al., 2005). Em 1998, doenças do pâncreas (pancreatite aguda e crônica) foram responsáveis por 327.000 internações hospitalares. Em 2000 o custo direto e indireto de doenças pancreáticas foi estimado em 2,5 bilhões de dólares. No mesmo ano, houve 2.834 mortes nos Estados Unidos devido a pancreatite aguda, tornando-a a 14ª causa mais comum de mortes por doenças gastrointestinais (Longo et al., 2011).

De acordo com o DATASUS e IBGE (2006), a incidência no Brasil é de 15,9 casos anuais para cada 100.000 habitantes (Campos et al., 2008). No ano de 2015, ocorreram cerca de 34.281 internações no Brasil por pancreatite e outras doenças do pâncreas, que resultaram em 1.921 óbitos no país. Este número representa um custo de aproximadamente R\$ 26 milhões aos cofres públicos. Entre os meses de janeiro de 2016 a janeiro 2017 foram registradas 34.571 internações, que resultaram em 1.791 óbitos no país, sendo a maior incidência na região sudeste. Esse quadro representa um custo de aproximadamente 27 milhões de reais neste período (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A maioria dos pacientes tem apenas um leve curso autolimitado da doença, denominado pancreatite edematosa ou leve (75 a 85% dos casos), com uma taxa de mortalidade associada abaixo de 1%, enquanto que pancreatite aguda grave ocorre em 15 a 25% dos casos, e tem um risco de mortalidade de 10 a 24% (Sekimoto et al., 2006).

Em 1856, Claude Bernard sugeriu que o refluxo biliar no ducto colédoco seria o gatilho que desencadeia a pancreatite aguda. Posteriormente, Eugene Opie (1901) propôs que a migração de cálculos biliares no ducto colédoco foi a principal causa da pancreatite aguda, com base em duas autopsias realizadas em pacientes jovens, no qual foram encontrados cálculos biliares obstruindo o orifício do ducto pancreático.

Os dois maiores fatores etiológicos responsáveis pela pancreatite aguda são o consumo excessivo de álcool e os cálculos biliares, representando entre 70 a 80% dos casos. A proporção dos casos entre esses dois principais fatores varia consideravelmente entre países e regiões (Pandol et al., 2007; Sekimoto et al., 2006; Swaroop et al., 2004; Wang et al., 2009). Alterações anatômicas e/ou funcionais do pâncreas, doenças autoimunes (lúpus eritematosos sistêmicos), hipercalcemia, hiperparatireoidismo, infecções pancreáticas e trauma acidental ou iatrogênico também podem causar pancreatite aguda. (Carroll et al., 2007).

Embora haja controvérsias, a maioria dos pesquisadores acreditam que após a ocorrência do episódio desencadeador, a pancreatite aguda é iniciada pela prematura ativação de tripsina nas células acinares pancreáticas, bem como a retenção de enzimas que levam à autodigestão do pâncreas e, conseqüentemente, à inflamação da glândula (Figura 1). Esse processo pode ser desencadeado quando mecanismos protetores que previnem a ativação do tripsinogênio ou mecanismos que reduzem a atividade da tripsina são suprimidos ou diminuídos. Pode ocorrer a clivagem de tripsinogênio em tripsina pela hidrolase lisossomal catepsina-B, diminuição da atividade ou síntese do inibidor SPINK1, inibição da autólise de tripsina, perda de compartimentalização enzimática e alteração da concentração de cálcio intracelular, gerando disfunção na sinalização de cálcio (Banks e Freeman, 2006; Frossard et al., 2008).

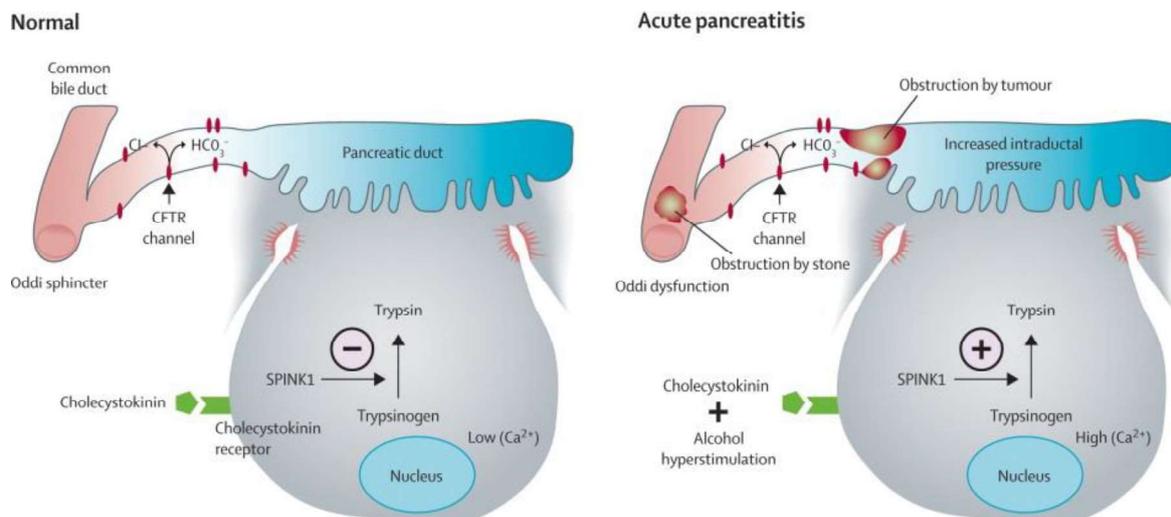


Figura 1 – Principais mecanismos desencadeadores da pancreatite aguda. Após a ocorrência do episódio desencadeador, a pancreatite aguda é iniciada pela prematura ativação de tripsina nas células acinares pancreáticas, bem como a retenção de enzimas que levam a autodigestão do pâncreas e, conseqüentemente, inflamação da glândula. Pode ocorrer a clivagem de tripsinogênio em tripsina, diminuição da atividade ou síntese do inibidor SPINK1, alteração dos níveis de cálcio, entre outros mecanismos. Retirado de: Frossard et al., 2008.

O dano na célula acinar pancreática resulta em uma resposta inflamatória local, com a participação de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, PAF, IL-10, C5a, ICAM-1, e substância P. Além disso, esses mediadores inflamatórios também podem alcançar a circulação sistêmica e serem determinante na gravidade da pancreatite aguda, causando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica e, conseqüentemente, síndrome de disfunção múltipla de órgãos (Bhatia et al., 2000). Tal assunto será abordado mais detalhadamente adiante.

A pancreatite aguda é definida pela presença de dor abdominal, que pode vir acompanhada de náuseas e vômitos. Dependendo da gravidade, pode-se incluir distensão abdominal, taquicardia, hipotensão, hemorragia retro peritoneal,

entre outros (Banks e Freeman, 2006; Al-Haddad et al., 2009). As dosagens de lipase sérica e/ou amilase sérica são os exames para diagnóstico mais utilizados, que normalmente encontram-se elevadas, sendo a dosagem de lipase o exame primário laboratorial, pois apresenta alta sensibilidade, especificidade e se mantém elevado por vários dias, ao contrário da amilase (Guimarães et al., 2009). As alterações histopatológicas da pancreatite aguda incluem edema dos lóbulos pancreáticos, necrose da gordura peripancreática, infiltração de neutrófilos nos espaços intersticiais e, na pancreatite aguda grave, áreas necróticas e hemorrágicas podem ser visualizadas (Al-Haddad et al., 2009; Banks e Freeman, 2006).

Para o tratamento utiliza-se a terapia de suporte, com reposição hídrica, controle da dor, suspensão da alimentação por via oral, fluidoterapia, antieméticos e administração de oxigênio dependendo do quadro clínico. Quando o quadro do paciente é mais grave, faz-se necessário a conduta com outros recursos terapêuticos a cirurgia para a remoção de áreas necrosadas. O tratamento não inclui a cura da doença, apenas faz o controle dos sintomas apresentados pelo paciente (Frossard et al., 2008).

1.1.3 O álcool e a pancreatite aguda alcoólica

Doenças relacionadas com o álcool representam um significativo problema social e de saúde pública. Um dos órgãos digestivos mais importantes afetado pelo abuso de álcool é o pâncreas. Em 1878, Friedreich fez a primeira associação do abuso de álcool com lesão pancreática crônica (Friedreich 1878). Hoje é amplamente conhecido que o álcool causa desde episódios agudos a manifestações crônicas de injúrias no pâncreas. Várias teorias têm sido propostas para explicar os efeitos prejudiciais do etanol na pancreatite aguda. Entre elas, a formação de tampões protéicos (Guy et al., 1983), estresse oxidativo (Altomare et al., 1996; Sanfey et al., 1985), efeitos diretos do álcool (Katz et al., 1996), disfunção mitocondrial associada ao metabolismo do etanol (Shalbueva et al., 2013) e toxicidade dos metabólitos não oxidativos causada pela sustentada elevação de cálcio nas células acinares pancreáticas (Cridde, 2004).

Contudo, ainda não se tem um consenso da epidemiologia e não é claro como diferentes doses de álcool afetam o desenvolvimento de doenças pancreáticas, bem como o motivo de apenas alguns alcoólicos desenvolverem tais doenças. (Apte et al., 2010; Herreros-Villanueva et al., 2013).

O pâncreas exócrino utiliza as vias metabólicas oxidativa e não oxidativa para a metabolização do álcool (Figura 2), e o balanço entre essas duas rotas pode ser fundamental na determinação de seus efeitos tóxicos (Criddle, 2015). As enzimas álcool desidrogenase (ADH) e citocromo P450 2E1 (CYP 2E1) catalisam o metabolismo oxidativo do etanol. A metabolização do etanol por essas duas enzimas resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e acetaldeído. Embora o pâncreas expresse tanto ADH quanto CYP 2E1, a expressão dessas enzimas é muito baixa se comparada ao fígado. A via metabólica não oxidativa ocorre com a participação de um diverso grupo de enzimas conhecidas como etil ésteres de ácidos graxos (FAEEs) sintases. O metabolismo do álcool por essas enzimas combina lipídeos livres com etanol, gerando FAEEs. No pâncreas, FAEEs sintases possuem alta atividade quando comparadas com o fígado. Portanto, pelo fato da via oxidativa possuir relativa baixa atividade no pâncreas, o metabolismo mais ativo, o não oxidativo, possui um importante papel nas disfunções pancreáticas associadas ao álcool e desenvolvimento de pancreatite aguda alcoólica (Apte et al., 2010; Clemens et al., 2016; Soderberg et al., 2013).

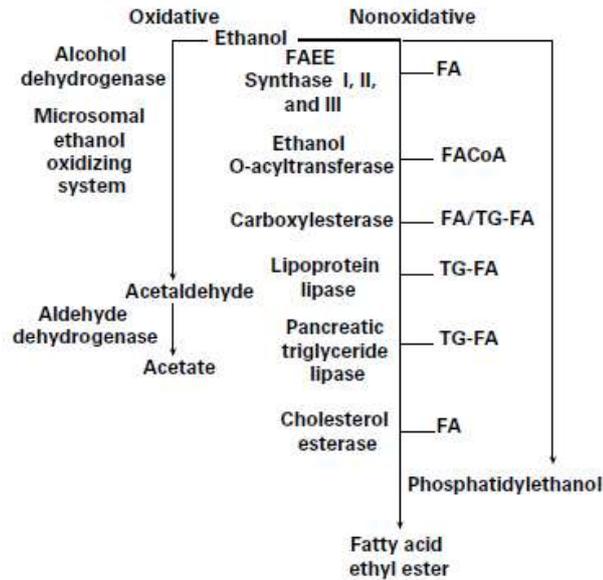


Figura 2 – Vias oxidativas e não oxidativas do metabolismo do etanol. FA, ácido graxos; FAcCoA ácido graxo coenzima A; FAEEs, etil ésteres de ácidos graxos; TG triglicéride. Retirado de: Soderberg et al., 2003.

Os produtos do metabolismo oxidativo (acetaldeído e ROS) e do metabolismo não oxidativo do álcool (FAEEs) têm sido destacados como causadores de danos nas células acinares. A administração de etanol resulta no aumento de amilase e colecistoquinina (CCK) plasmática (Chowdhury et al., 2006). Estudos *in vivo* mostraram que o acetaldeído, em altas concentrações, causa danos morfológicos no pâncreas de ratos e cachorros (Nordbak et al., 1991). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a ingestão de álcool causa stress oxidativo no pâncreas, causando uma possível desestabilização nos grânulos de zimogênio e lisossomos. Terapias antioxidantes indicam uma melhora clínica e experimental na pancreatite, suportando a ideia do papel do estresse oxidante na lesão pancreática (Apte et al., 2010).

Recentemente, o papel de lipídeos no desenvolvimento de pancreatite aguda tem ganhado considerável atenção, principalmente a possível ligação entre os danos pancreáticos em razão da associação de gorduras e álcool. Estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em lipídeos podem estar

relacionadas ao desenvolvimento de pancreatite aguda e crônica. (Criddle, 2015; Dufour et al., 2003). Estudos utilizando modelos experimentais têm reforçado a ideia de que a associação de lipídeo e álcool pode induzir lesão pancreática e, a utilização sob essas mesmas condições, de somente lipídeo ou álcool, torna a indução ineficaz. A aplicação de etanol sozinho não é capaz de induzir pancreatite aguda experimental. A adição de outros agentes como CCK, LPS ou lipídeo são necessários para gerar lesão no pâncreas (Criddle, 2015; Huang et al., 2014; Kono et al., 2001). Huang e colaboradores (2014) mostraram que o tratamento de células acinares isoladas, com etanol e um ácido graxo (ácido palmitoleico), causa um aumento do cálcio intracelular resultando em necrose celular.

Um estudo de referência demonstrou que os FAEEs se acumulam em grande quantidade no pâncreas de indivíduos que morreram após um episódio de intoxicação aguda por álcool. Além disso, a quantidade de FAEEs encontrada no pâncreas foi positivamente correlacionada com a quantidade de álcool no sangue, sugerindo o potencial dos metabólitos não oxidativos de mediar a toxicidade do pâncreas em condições de consumo excessivo de álcool. (Laposata e Lange, 1986).

Vários estudos recentes têm demonstrado que os metabólitos da via não oxidativa do álcool possuem a capacidade de causar dano no pâncreas (Apte et al., 2010; Criddle, 2015). Werner e colaboradores (1997) mostraram que a infusão intra-arterial de FAEEs, em ratos, causa edema pancreático, vacuolização de células acinares, ativação de tripsinogênio e aumento de matriz extracelular, características típicas de pancreatite aguda (Werner et al., 1997). Posteriormente, este grupo de pesquisa mostrou que a administração intravenosa de etanol foi capaz de aumentar a concentração de FAEEs no plasma e no pâncreas. Além disso, quando eles inibiram farmacologicamente o metabolismo oxidativo do etanol, encontraram aumento dos níveis de FAEEs, maior toxicidade no pâncreas e exacerbação da inflamação (Werner et al., 1997). Estudos *in vitro* também evidenciam o dano acinar causado pelos FAEEs. Haber e colaboradores (1993) mostraram que em concentrações conhecidas, os metabólitos não oxidativos desestabilizam os lisossomos nas células acinares pancreáticas (Haber et al., 1993). Criddle e colaboradores (2004, 2006)

mostraram *in vitro* que FAEEs causam uma toxicidade nas células acinares por elevação de íons cálcio (Criddle et al., 2004, 2006).

O cálcio intracelular possui importante papel fisiológico nas células acinares, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. A secreção dos grânulos de zimogênio das células acinares, em condições fisiológicas, é controlada pela liberação local de pequenas quantidades de cálcio. Uma sustentada elevação de liberação de cálcio de reservas intracelulares causa diversas mudanças patológicas nas células acinares, como ativação de tripsinogênio, alterações no lúmen do retículo endoplasmático, disfunção do metabolismo mitocondrial e necrose celular. O cálcio possui, então, um papel central na sinalização de células acinares, controlando a secreção enzimática e sua sobrecarga na célula possui um papel importante no desenvolvimento da pancreatite aguda (Gerasimenko et al., 2009, 2014; Ward et al., 1995).

1.1.4 Modelos experimentais de pancreatite aguda

Modelos experimentais de pancreatite aguda que se assemelham com a doença que ocorre em humanos são fundamentais para ampliar o entendimento de mecanismos complexos e para a elaboração de estratégias terapêuticas para a doença. Vários modelos experimentais de pancreatite aguda têm sido reproduzidos. Esses modelos podem ser divididos em invasivos e não invasivos, variando de acordo com o método de indução da doença. Um modelo ideal de pancreatite aguda deve ser de fácil reprodutibilidade, com capacidade de variar a gravidade da pancreatite aguda de forma padronizada com os objetivos experimentais, assemelhando-se com a doença nos humanos (Hue Su et al., 2006).

Modelos não invasivos

Modelo induzido por hormônio: a ceruleína, um análogo da colecistoquinina, tem sido utilizado com sucesso na indução de pancreatite aguda em ratos (Lampel et al., 1977; Watanabe et al., 1984), camundongos (Niederau et al., 1985) e cachorros (Renner et al., 1983). Nesse modelo, a

administração de ceruleína pode ser pela via intravenosa, subcutânea ou intraperitoneal, o que leva a um aumento dos níveis de enzimas proteolíticas causando autólise de células acinares (Konturek et al., 1992). É um modelo relativamente simples e barato de executar, porém, apesar de doses altas de ceruleína, somente a pancreatite aguda leve é desenvolvida (Hue Su et al., 2006).

Modelo induzido por álcool: o efeito agudo do etanol no pâncreas têm sido estudo em vários modelos animais, com o objetivo de investigar os mecanismos fisiopatológicos que levam o álcool a induzir pancreatite aguda. Apesar de ser um modelo animal de pancreatite aguda relativamente simples e barato de se executar, a maioria deles são ineficazes na indução da doença, necessitando de outros agentes para a indução do modelo (Criddle, 2015; Huang et al., 2014; Hue Su et al., 2006; Luthen et al., 1994; Quon et al., 1992).

Modelo imunomediado: modelos de pancreatite aguda imunomediado envolve, geralmente, a infusão de agentes, como toxinas de bactéria (Thal e Brackney, 1954), ovalbumina (Thal, 1955), soro de outros camundongos (Janingan et al., 1975), entre outros, no ducto pancreático. Esses agentes no ducto vão gerar um processo inflamatório no pâncreas, resultando em pancreatite aguda. Modelos imunomediados não são recomendados para o estudo de pancreatite aguda, pois são de difíceis execução e reprodutibilidade, levam muito tempo, são relativamente caros e não possuem uma relevância clínica esclarecida (Hue Su et al., 2006).

Modelo induzido por dieta: Lombardi e colaboradores (1975) desenvolveram um modelo de pancreatite aguda induzido pela dieta deficiente em colina contendo etionina, em camundongos fêmeas. O protocolo pode ser modificado com o objetivo de manipular a gravidade da doença (Gilliland et al., 1980). É um modelo relativamente simples, de execução barata, com alta reprodutibilidade e bem estabelecido no estudo de pancreatite aguda hemorrágica. Porém, a relevância do modelo em relação a etiologia da doença em humanos é duvidosa. Além disso, o modelo induzido por dieta só é reproduzido em camundongos fêmeas (Hue Su et al., 2006).

Modelo induzido por L-arginina: Mizunuma e colaboradores (1984) desenvolveram um modelo de pancreatite aguda em ratos que reproduz a pancreatite aguda grave pela administração de uma dose alta de L-arginina. Os mecanismos pelos quais a L-arginina causa pancreatite aguda ainda são desconhecidos, mas há indícios que radicais livres de oxigênio e óxido nítrico, além de mediadores inflamatórios, podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença. É um modelo com alta reprodutibilidade e a administração de L-arginina é dose-dependente para o efeito de necrose das células acinares (Hue Su et al., 2006).

Modelos invasivos

Como a maioria dos modelos de pancreatite aguda possuem alta variabilidade no curso e na gravidade da doença, modelos de pancreatite aguda invasivos foram criados para tentar reproduzir essa situação da pancreatite aguda grave. Além disso, a etiologia da maioria dos modelos não invasivos possui pouquíssima relevância clínica. Portanto, foram criados modelos invasivos para tentar solucionar esses problemas dos modelos não invasivos. A maioria dos modelos invasivos simulam mecanismos da pancreatite aguda induzida por cálculos biliares, observado em situações clínicas (Hue Su et al., 2006). Entre os modelos invasivos podemos citar o modelo por obstrução do ducto biliopancreático, perfusão do ducto pancreático, combinação de hiperestimulação secretória com exposição de ácidos biliares no ducto pancreático, isquemia/reperfusão no pâncreas, entre outros. As desvantagens de modelos de pancreatite aguda invasivos são a necessidade de intervenção cirúrgica, técnicas de difícil execução e muitas vezes, com difícil reprodutibilidade (Hue Su et al., 2006).

1.2 Lesão pulmonar associada à pancreatite aguda

1.2.1 O pulmão

O pulmão pode ser dividido em duas partes: vias aéreas centrais, que incluem traqueia, brônquios e bronquíolos terminais, e parênquima periférico,

representado pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolo. O pulmão do humano adulto é composto por 300 milhões de alvéolos e cada alvéolo possui por volta de 0,25 mm de diâmetro. As paredes interalveolares possuem uma rede de capilares que estão em contato com todo o alvéolo. Cada alvéolo possui por volta de 1000 segmentos de capilares, e toda a rede de capilares está conectada a 300 milhões de ramos de artérias terminais e a um número equivalente de veias. Estima-se que o pulmão possui uma área de superfície alveolar por volta de 100 m², o que explica sua eficiência na condução e difusão dos gases respiratórios (Burns et al., 2003; Hogg e Doerschuk, 1995; Weibel, 1984).

Dois tipos celulares recobrem a superfície alveolar. Os pneumócitos do tipo I são células epiteliais escamosas com prolongamentos citoplasmáticos, que penetram nos poros de Kohn, conectando um alvéolo a outro. Já os pneumócitos do tipo II são células epiteliais cuboides, que são responsáveis por sintetizarem e secretarem o surfactante pulmonar, forrando a superfície alveolar (Kuhn, 1978). Pneumócitos do tipo II também possuem a capacidade de proliferarem, originando mais células do tipo II ou, até mesmo, diferenciarem e substituírem pneumócitos do tipo I que tenham sofrido alguma lesão (Adamson e Bowden, 1974). Se expressado em porcentagem do número total de células dentro da parede alveolar, pneumócitos do tipo I representam 8%, do tipo II 16%, células endoteliais dos capilares 30%, células intersticiais 36% e macrófagos alveolares 10% (Burns et al., 2003; Weibel, 1984).

1.2.2 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A primeira descrição da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) apareceu em 1967, quando Ashbaugh e colaboradores descreveram 12 pacientes com insuficiência respiratória aguda, cianose refratária a oxigenoterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado evidenciado na radiografia do peito (Ashbaugh et al., 1967). Posteriormente, múltiplas definições foram propostas e utilizadas até a publicação da Conferência de Consenso Europeia-Americana (AECC) de 1994, que definiu SDRA como uma síndrome de insuficiência respiratória de instalação aguda, caracterizada por

infiltrado pulmonar bilateral à radiografia de tórax, compatível com edema pulmonar; hipoxemia grave, definida como relação $\text{PaO}_2 / \text{FIO}_2 \leq 200$ mm Hg (pressão parcial de oxigênio pela fração de oxigênio inspirado); ausência de sinais clínicos ou ecocardiográficos de hipertensão atrial esquerda; presença de um fator de risco para lesão pulmonar. Além dessa definição de SDRA, foi criado o Lesão Pulmonar Aguda (LPA), cuja definição é idêntica à da SDRA, exceto pela menor gravidade de hipoxemia ($\text{PaO}_2 / \text{FIO}_2 \leq 300$ mm Hg) (Bernard et al., 1994). Em 2012, o Consenso de Berlim passou a classificar SDRA como leve, moderada e grave, excluindo o termo LPA (Ranieri et al., 2012) (Tabela 1). Portanto, o termo LPA/SDRA que era utilizado até 2012, será referido apenas como SDRA.

Critério	LEVE	MODERADA	GRAVE
Tempo de início	Aparecimento súbito dentro de 1 semana após exposição a fator de risco ou aparecimento ou piora de sintomas respiratórios.		
Hipoxemia (PaO₂/FIO₂)	201-300 mm Hg	101-200 mm Hg	≤ 100 mm Hg
Origem do Edema	Insuficiência Respiratória não claramente explicada por Insuficiência Cardíaca ou sobrecarga volêmica		
Anormalidades Radiológicas	Opacidades bilaterais	Opacidades bilaterais	Opacidades bilaterais

Tabela 1 – Classificação da síndrome do desconforto respiratório aguda segundo a definição de Berlim, 2012. Modificado de: Barbas et al., 2013.

As causas que resultam em SDRA podem ser injúria de origem sistêmica ou pulmonar, dividindo a SDRA em extrapulmonar e pulmonar, respectivamente. Entre as causas mais comuns se encontram sepse (principalmente sepse grave de origem pulmonar), pneumonia, contusão, aspiração, dano por inalação, trauma, lesão por queimadura, múltiplas transfusões de sangue, toxicidade de algumas drogas e pancreatite aguda (Perl et al., 2011; Tsushima et al., 2009). A SDRA extrapulmonar e pulmonar são doenças com diferentes causas e possuem diferentes características fisiopatológicas (Gattinoni et al., 1998; Pelosi

et al., 2003). Este estudo se concentra na SDRA extrapulmonar causada por pancreatite aguda.

A pancreatite aguda pode ser dividida em três principais fases. Resumidamente, na fase inicial ocorrem eventos relacionados a etiologia da doença, principalmente cálculos biliares e abuso de álcool, que interferem na secreção enzimática das células acinares. A segunda fase da pancreatite aguda é caracterizada pelas mudanças que ocorreram após o insulto inicial na célula acinar. Entre essas mudanças, se encontram ativação de enzimas digestivas estocadas nos grânulos de zimogênio e lesão da célula acinar. A terceira e última fase envolve eventos extra-acinares, tanto no pâncreas quanto em outros órgãos (Steer ML, 1999). Como dito anteriormente, os mediadores inflamatórios liberados localmente no pâncreas podem alcançar a circulação sistêmica e por ativação parácrina causar a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Um dos principais elementos na patogênese da pancreatite aguda é a transição da inflamação local para a inflamação sistêmica, aumentando a gravidade da doença. Mediadores inflamatórios secretados por macrófagos ativados, neutrófilos e outras células possuem um papel decisivo no início da SIRS e na progressão de mudanças de aspecto inflamatório no pâncreas e outros tecidos, podendo causar complicações em órgãos remotos, principalmente no pulmão. (Bhatia et al., 2000; Chooklin 2009).

Na forma grave da pancreatite aguda, por volta de 75% dos pacientes desenvolvem complicações pulmonares, desde hipoxemia à SDRA (Browne e Pitchumoni, 2006), sendo que o desenvolvimento da síndrome de disfunção múltipla de órgãos, especialmente SDRA, é responsável por cerca de 15%-20% de mortalidade da doença (Corfield et al., 1985). A SDRA apresenta-se clinicamente com dispneia grave e hipoxemia extrema, refratária ao suplemento de altas concentrações de oxigênio (Browne e Pitchumoni, 2006). O pulmão é o órgão remoto mais afetado pela pancreatite aguda grave, e as complicações pulmonares são as principais causas de morte nos pacientes com a doença (Renner et al., 1985), gerando um importante problema de saúde pública.

A lesão pulmonar associada à pancreatite aguda inicia-se com a ação de mediadores inflamatórios provenientes do pâncreas secretados na circulação

sistêmica. Neutrófilos provenientes da circulação invadem o tecido pulmonar, causando lesão na membrana de interface alvéolo-capilar e extravasamento vascular (Gross et al., 1993). O primeiro alvo a ser lesionado é o endotélio vascular pulmonar, com um aumento da permeabilidade vascular e edema intersticial, seguido de lesão das células epiteliais (Pelosi et al., 2003). As principais características da SDRA extrapulmonar envolvem uma fase inicial exudativa com dano alveolar difuso, lesão microvascular, necrose de pneumócitos do tipo I e influxo de células inflamatórias, seguido por uma fase proliferativa, com reparo, hiperplasia de pneumócitos do tipo II e proliferação de fibroblastos (Pastor et al., 2003).

As principais alterações da mecânica pulmonar na SDRA é: i) a redução da complacência, decorrente do edema intersticial e alveolar, além do colapso alveolar, exigindo grandes pressões para abertura, durante a inspiração; ii) aumento da resistência das vias aéreas, decorrente do acúmulo de líquido e espessamento das paredes das vias aéreas distais (Pinheiro e Oliveira, 2004).

O desenvolvimento de eficientes estratégias de tratamento da SDRA associada à pancreatite aguda é crucial para a melhora dos resultados nos pacientes com pancreatite aguda grave. A terapia para SDRA deve envolver dois principais aspectos: modulação de mediadores inflamatórios e estratégias de ventilação mecânica. Apesar de que vários estudos vêm sendo feitos, e várias moléculas têm sido apontadas como possíveis alvos para o tratamento da SDRA, não há um consenso sobre os efeitos benéficos, revelando a necessidade de mais estudos. A estratégia de tratamento mais utilizada é a ventilatória, que utiliza a administração de oxigênio ou estratégias de ventilação mecânica mais avançadas, que reduzem a mortalidade em decorrência da SDRA (DeCampos et al., 2007).

1.2.3 Mediadores inflamatórios

Gukovsky e colaboradores (1998) relataram pela primeira vez, a ativação do Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) em células acinares durante a pancreatite. O NF- κ B é um fator de transcrição central que controla a expressão de vários genes

de mediadores pró-inflamatórios, por exemplo, TNF- α , IL-6, IL-8 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O NF- κ B está envolvido em respostas inflamatórias, com participação na síntese de vários mediadores inflamatórios que são importantes na pancreatite aguda. A superexpressão desses fatores na pancreatite aguda pode causar lesão no tecido pancreático e extra pancreático. (Akbarshahi et al., 2012; Gukovsky et al., 1998).

A geração de inflamação sistêmica é orquestrada por mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e outros fatores que regulam a resposta inflamatória local e sistêmica, a extensão da morte de células pancreáticas e a lesão pulmonar associada à pancreatite aguda (Lerch et al., 1993). Citocinas e quimiocinas participam na ativação e recrutamento de leucócitos para o foco da lesão acinar. A ativação de leucócitos possui um importante papel na secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como TNF- α , IL-6, IL-8, produzidas por monócitos e macrófagos residentes (Cuzzocrea et al., 2002; Yang et al., 2004). Essas citocinas podem agir localmente, agravando a lesão pancreática, e também sistemicamente, aumentando a permeabilidade capilar e promovendo a adesão leucocitária e extravasamento de proteínas (Kyriakides et al., 2001).

Citocinas

O TNF- α é produzido e secretado, predominantemente, por macrófagos ativado. A ativação de NF- κ B em macrófagos de animais com pancreatite aguda desempenha um papel importante na transcrição e biossíntese de TNF- α e IL-1 β (Norman et al., 1995). Logo após o insulto inicial, o TNF- α é considerado o primeiro mediador da cascata inflamatória, regulando a síntese de várias citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão nos neutrófilos (CD11b/CD18) e células endoteliais (ICAM-1). O TNF- α pode ser detectado no tecido pancreático e soro 1 hora após o início da pancreatite aguda, aumentando rapidamente até 6 horas após o insulto inicial. Contudo, sua quantidade na circulação não é um bom indicador de gravidade da doença, visto que o fígado faz uma limpeza rápida de TNF- α da circulação sistêmica. Essa citocina pró-inflamatória também é produzida em órgão remotos, como o pulmão, mas isso ocorre em um

momento posterior (Akbarshahi et al., 2012; Bhatia et al., 2000; Hughes et al., 1995).

Assim como o TNF- α , o IL-1 β é uma outra potente citocina pró-inflamatória derivada, predominantemente, de macrófagos ativados. IL-1 β compartilha de várias propriedades inflamatórias semelhantes com o TNF- α , ativando neutrófilos e induzindo a regulação positiva de moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais. A infusão combinada de TNF- α e IL-1 β possui efeitos pró-inflamatórios sinérgicos. Estudos utilizando camundongos deficientes para o receptor de IL-1 β , receptor de TNF- α , ou ambos, contribui para a gravidade do episódio agudo de pancreatite. Prevenir a ação de ambas citocinas não possui um efeito adicional no grau da pancreatite, mas atenua a resposta do estresse sistêmico (Bhatia et al., 2000; Denham et al., 1997). Além disso, tratamento isolado de células acinares com TNF- α e IL-1 β não resulta em ativação ou secreção de enzimas. Em adição, perfusão de TNF- α e IL-1 β em pâncreas isolado de humano não induz pancreatite aguda. Portanto, TNF- α e IL-1 β parecem não serem determinantes na causa da pancreatite aguda, mas sim na cascata inflamatória subsequente aos eventos de lesão das células acinares (Norman et al., 1996).

TNF- α e IL-1 β estimulam macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas a produzirem IL-6. Elevadas quantidades de IL-6 têm sido descritas em um grande número de condições inflamatórias agudas, como queimaduras, grandes cirurgias, sepses e pancreatite aguda. Correlações de altos níveis de IL-6 com gravidade da pancreatite aguda têm sido descritas, tornando o IL-6 um bom indicador da gravidade da doença e mediador da resposta inflamatória na fase aguda, desde que dosado na fase inicial (Bhatia et al., 2000).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com papel importante na inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) por macrófagos, prevenindo a lesão tecidual (Seitz et al., 1995; van der Poll et al., 1975). Em condições fisiológicas, IL-10 não é detectável no soro. Em condições de pancreatite aguda, a concentração de IL-10 aumenta nas primeiras 24 horas, seguido de um declínio em poucos dias. A concentração de IL-10 na pancreatite

aguda leve é maior quando comparada com a pancreatite aguda grave (Bhatia et al., 2000). Além disso, IL-10 inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos alveolares envolvidos na SDRA (Lo et al., 1998). Em estudos clínicos, pacientes com SDRA possuem baixas concentrações de IL-10 no soro e lavado bronco alveolar (BAL), além de altas concentrações de TNF- α no BAL (Armstrong et al., 1997). Outro estudo mostra que a administração de IL-10 na pancreatite aguda experimental reduz a resposta inflamatória local e a mortalidade dos animais (Kusske et al, 1996; Rongione et al, 1997). Portanto, o balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é de fundamental importância no curso da doença.

Molécula de adesão intercelular (ICAM-1)

A ICAM-1 uma proteína induzida expressa na superfície de células endoteliais, importante para adesão leucocitária e migração para o tecido. Em condições fisiológicas, ICAM-1 não é expressada ou é expressada em pequenas quantidades nos tecidos. Em contrapartida, durante momentos inflamatórios, elas são reguladas positivamente, passando a ser expressas em grandes quantidades nas células endoteliais (Springer, 1990). Animais deficientes para ICAM-1 são protegidas da pancreatite aguda e da lesão pulmonar associada (Frossard et al., 1999). Outro estudo mostra que os efeitos protetivos da deleção do gene da ICAM-1 não são diferentes dos efeitos protetivo da depleção de neutrófilos, apontando seu importante papel no desenvolvimento da pancreatite e subsequente lesão do pâncreas e pulmão (Bhatia et al., 1998).

Fator de ativação plaquetária (PAF)

Outro mediador inflamatório importante é o PAF, um fosfolípídeo com baixo peso molecular que age via receptores específicos presentes na superfície de vários tipos celulares, incluindo plaquetas, leucócitos e células endoteliais. O PAF possui a função pró-inflamatória de promover o recrutamento e ativação de células inflamatórias. Células acinares pancreáticas isoladas sintetizam PAF, e

a sua concentração em tecidos pancreáticos e em outros locais, como sangue e pulmão, aumenta na pancreatite aguda. Em modelos animais, a injeção intraperitoneal ou intravascular de PAF pode aumentar a gravidade da pancreatite aguda, indicando o PAF como um importante mediador da resposta inflamatória sistêmica (Bhatia et al., 2000; Konturek et al., 1992; Zhou et al., 1993). Antagonistas específicos de receptores de PAF têm sido avaliados experimentalmente. O tratamento profilático com antagonistas para o receptor de PAF causa redução da inflamação local e da necrose de células acinares na pancreatite aguda (Formella et al., 1994). Em um outro estudo, após a indução da pancreatite aguda experimental, a degradação do PAF induzida pela enzima fator de ativação plaquetária acetilhidrolase foi capaz de promover a proteção contra a pancreatite aguda e a lesão pulmonar associada (Hofbauer et al., 1998).

Substância P

A substância P é um neuropeptídeo pró-inflamatório envolvido na pancreatite aguda. Sua principal função biológica é mediada via ligação com o receptor NK-1R. Durante a inflamação aguda, a substância P induz a secreção de quimiocinas inflamatórias por macrófagos infiltrados no foco inflamatório local e em tecidos mais distantes. Camundongos deficientes para o receptor NK-1R são protegidos da pancreatite aguda e da lesão pulmonar associada, em um modelo experimental induzido por ceruleína (Bhatia et al., 1998; Sun et al., 2007), destacando seu papel pró-inflamatório na doença.

C5a

O fragmento de proteína C5a é um componente do sistema de complemento, gerado a partir de C5 como parte da via clássica e alternativa. O C5a é uma potente anafilotaxina e quimiotático que age via ligação com seu receptor C5aR na superfície das células, responsável pela quimiotaxia de todas as células da linhagem mieloide, além de estimular a contração do músculo liso, aumentar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, o que destaca seu

papel pró-inflamatório (Bhatia et al., 2001). Por outro lado, um estudo em camundongos deficientes para o receptor C5aR, mostra que os animais são incapazes de realizarem a limpeza do *Pseudomonas aeruginosa* instilada intrapulmonar, apesar de sua habilidade em mobilizar neutrófilos para o pulmão (Hopken et al., 1996). Bhatia e colaboradores (1997) mostraram que camundongos deficientes para o receptor C5a sofrem ataques mais graves de pancreatite e lesão pulmonar associada quando comparados com camundongos selvagens, apontando para um inesperado, mas importante papel anti-inflamatório do C5a na pancreatite aguda (Bhatia et al., 2000; Gerard et al., 1994).

Quimiocinas

Quimiocinas são pequenas moléculas (8-12 kDa), inicialmente descritas como citocinas quimiotáticas (Luster, 1998). Essas proteínas desempenham um importante papel fisiológico na biologia dos leucócitos e de outros tipos celulares, controlando a ativação e o recrutamento celular em estados basais e inflamatórios, bem como guiando os movimentos dos leucócitos (Mantovani, 1999; Russo et al., 2014).

O sistema de quimiocinas nos mamíferos é complexo, abrangendo cerca de 50 ligantes, constitutivamente expressos ou induzidos por diferentes estímulos, e 20 receptores de 7 domínios transmembranas pertencentes à classe A dos receptores transmembranas acoplados a proteína G (GPCRs) do tipo rodopsina. A sinalização mediada pela ligação quimiocina com seu receptor causa uma mudança conformacional na estrutura terciária deste receptor e subsequente endocitose, disparando sinais de ativação intracelular (Thelen e Stein, 2008).

Apesar desse amplo repertório de quimiocinas, elas se relacionam intimamente, sendo consideravelmente promíscuas quanto à ativação de receptores. Há, então, uma redundância funcional no sistema de quimiocinas: a maioria dos ligantes interagem com mais de um receptor, e a maioria dos receptores interagem com vários ligantes (Mantovani et al., 1999). Elas são

subdivididas em 4 grupos de acordo com a posição relativa dos resíduos de cisteína conservados: CXC, CC, CX3C e C, sendo a letra "C" referente a um resíduo de cisteína. A subfamília CC tem as duas primeiras cisteínas adjacentes. No grupo CXC, as duas primeiras cisteínas estão separadas por um aminoácido, sendo que alguns membros desta sub-família contêm um motivo antes da primeira cisteína amino-terminal, denominado ELR (Glutamato- Leucina- Arginina), o qual é responsável pela divisão em dois sub-grupos: quimiocinas CXC-ELR+ e CXC-ELR-. A subfamília CX3C é caracterizada por possuir duas cisteínas separadas por três aminoácidos, enquanto na subfamília C, a primeira cisteína é ausente (Luster et al., 1998; Murphy et al., 2000; Zlotnik e Yoshie, 2000).

O CXCL8 (IL-8) é uma quimiocina da família CXC e está envolvido em diversos distúrbios inflamatórios pulmonares, incluindo lesão pulmonar associada à pancreatite. É uma potente quimiocina com propriedades quimiotáticas, principalmente, para neutrófilos, secretada por uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, células T, células NK, queratinócitos e condrócitos (Jeannin et al., 1994; Russo et al., 2014). Roedores não apresentam um homólogo direto do CXCL8, mas as quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2) são homólogos funcionais do CXCL8 e contribuem para a patologia em modelos murinos de doenças dependentes de neutrófilos (Sekido et al., 1993; Souza et al., 2004).

CXCL8 desempenha um papel crucial na SDRA de várias etiologias. Em modelos animais, os níveis dessa quimiocina estão elevados no pulmão (Colletti et al., 1995; Bhatia et al., 2000), e a neutralização dessas quimiocinas ou dos seus receptores pode atenuar a lesão pulmonar (Sue et al., 2004). Além disso, altas concentrações de CXCL8 circulantes foram correlacionadas com a mortalidade de pacientes em condições inflamatórias sistêmicas (Hack et al., 1992), se tornando um bom indicador de gravidade da doença.

O recrutamento de neutrófilos ativados para o pulmão ocorre através do leito capilar alveolar, que possui uma arquitetura distinta que favorece a migração de leucócitos para o órgão (Figura 3). Esse leito vascular é uma rede

complexa interconectada de pequenos seguimentos de capilares que passam de arteríolas para vênulas à medida que atravessam as paredes alveolares. O diâmetro dos neutrófilos (6-8 μm) é maior que o diâmetro de vários segmentos capilares (2-15 μm), e por volta de 50% dos neutrófilos são obrigados a se deformarem, alongando-se para atravessar estes capilares, o que possibilita um maior contato com o endotélio e uma circulação pulmonar lenta. Devido a isso, se comparado às demais grandes veias, o leito vascular pulmonar contém, aproximadamente, 50 vezes mais neutrófilos, linfócitos e monócitos (Burns et al., 2003). Além da estrutura pulmonar que propicia a migração de leucócitos, a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos (CD11b/CD18) e células endoteliais (ICAM-1) propiciam ainda mais a adesão e transmigração para o pulmão (Akbarshahi et al., 2012; Bhatia et al., 2012).

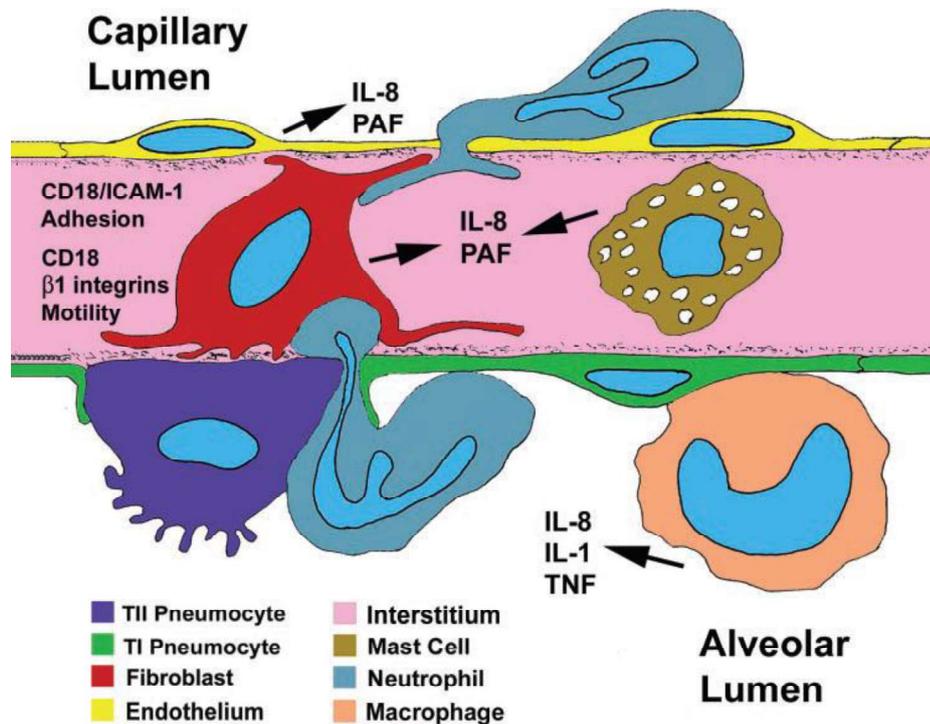


Figura 3 – Diagrama ilustrativo da migração leucocitária no pulmão. Neutrófilos migram diretamente do lúmen dos capilares para o espaço alveolar pela ação de quimiocinas, utilizando as junções tri-celulares endoteliais e moléculas de adesão. São guiados até as vias aéreas por fibroblastos intersticiais, onde emergem na junção tri-celular entre dois pneumócitos do tipo I e um pneumócito do tipo II. Retirado de: Burns, 2003.

Neutrófilos ativos recrutados para o pulmão secretam elastase, mieloperoxidase, substâncias proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas, que causam lesão endotelial e epitelial, amplificando toda a resposta inflamatória no pulmão (Akbarshahi et al., 2012; Goodman et al., 1998). Os neutrófilos estão presentes no pulmão de pacientes com SDRA (Goodman et al., 1998), e no pulmão de ratos em modelos de pancreatite induzida por ceruleína (Feddersen et al., 1991). Em um modelo de pancreatite aguda em ratos, a depleção de neutrófilos periféricos com anticorpo melhora a taxa de sobrevivência e o *score* histopatológico (Inoue et al., 1995). Outros estudos mostram que a depleção de neutrófilos no soro de animais diminui a permeabilidade vascular e os níveis de MPO no pulmão (Bhatia et al., 1998; Guice et al., 1989), destacando a importância do neutrófilo na fisiopatologia da pancreatite.

O CCL2 (MCP-1/JE) é uma quimiocina membro da família CC que controla o recrutamento de macrófagos, monócitos e linfócitos pela ligação com seu receptor CCR2 (, Frossard et al., 2011; Gerard et al., 2001; Rot et al., 200). É produzida por diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, células musculares lisas (Cushing et al., 1990; Standiford, 1991) e, principalmente, pelos macrófagos/monócitos (Yoshimura et al., 1989). Estudos utilizando camundongos deficientes para o receptor CCR2 ou que realizaram a depleção da quimiocina CCL2 mostraram que ambos são os maiores reguladores da migração de macrófagos (Dimitrijevic et al., 2006). O CCL2 é considerado um marcador sérico de inflamação no fígado, pâncreas e outros órgãos, como o pulmão. De acordo com Kamath e colaboradores (2016), CCL2 é a quimiocina chave no curso da pancreatite, mediando a infiltração de leucócitos, que resulta em dano local no pâncreas e secreção de mediadores inflamatórios por todo o corpo, afetando outros órgãos (Kamath et al., 2016). O seu nível sérico aumentado pode ser correlacionado com a gravidade da pancreatite aguda e com a lesão pulmonar associada (Zhou et al., 2010).

Frossard e colaboradores (2011) mostraram que os níveis de CCL2 e CCR2 se encontram aumentados durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína. Além disso, eles também concluíram que a depleção de CCL2 está associada com a redução do infiltrado de macrófagos/monócitos e de neutrófilos

no pâncreas e, conseqüentemente, com a gravidade da pancreatite e com a lesão pulmonar associada (Frossard et al., 2011). Bhatia e colaboradores mostraram que o bloqueio da síntese de CCL2 protege o camundongo contra a pancreatite aguda induzida por ceruleína (Bhatia et al., 2005).

A quimiocina CCL2 é um importante quimiotático de macrófagos/monócitos. Visto que os níveis de CCL2 se encontram elevados na pancreatite aguda e na lesão pulmonar associada, a ativação de diferentes populações de macrófagos contribui para a geração de mediadores inflamatórios sistêmicos. Particularmente, macrófagos peritoneais, células de Kupffer e macrófagos alveolares, ativados em diferentes estágios da pancreatite aguda, contribuem para a progressão da doença (Akbarshahi et al, 2012).

Macrófagos peritoneais expostos ao ambiente pró-inflamatório secretado pelo pâncreas, no líquido ascítico, se tornam ativados e liberam mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , na cavidade peritoneal, podendo alcançar a circulação e contribuir com a resposta inflamatória sistêmica associada à pancreatite aguda (Dugernier et al., 2000). As células de Kupffer, macrófagos residentes do fígado, podem entrar em contato com mediadores inflamatórios secretados pelo pâncreas que sofreu injúria, ou no ambiente pró-inflamatório do líquido ascítico, tornando-se ativados e amplificando a manifestação inflamatória sistêmica pela secreção de mais citocinas e quimiocinas na corrente sanguínea (Folch-Puy, 2007).

Por último, temos a população de macrófagos alveolares, que são importantíssimos no desenvolvimento da lesão pulmonar associada à pancreatite aguda. Os macrófagos alveolares estão envolvidos no desenvolvimento de desordens agudas locais como consequência de estímulos extrapulmonares, como peritonites, trauma e pancreatite aguda. Eles possuem a capacidade de secretar uma grande quantidade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Possuem funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no trato respiratório, dependendo da fase da resposta inflamatória, fase inicial ou resolutive (Akbarshahi et al., 2012).

A ativação de macrófagos alveolares resulta no recrutamento de leucócitos da circulação, incluindo monócitos, neutrófilos e linfócitos, resultando em lesão pulmonar associada à pancreatite aguda, promovendo a resposta inflamatória inicial (Gea-Sorli et al., 2011). Como dito anteriormente, a ativação da via do NF- κ B nos macrófagos é um evento importante na pancreatite aguda, que desencadeia a secreção de vários mediadores inflamatórios. A inibição da ativação de NF- κ B pode reverter a lesão pulmonar na pancreatite aguda, inibindo a secreção de mediadores inflamatórios por macrófagos alveolares (Sailai et al., 2010). Esses mediadores inflamatórios, como TNF- α e CXCL8, são importantes na ativação celular e recrutamento de neutrófilos, respectivamente (Tsukahara et al., 1996). Outro papel importante dos macrófagos alveolares na progressão da pancreatite aguda é a secreção do mediador pró-inflamatório PAF, importante na gravidade da doença e associado à altas taxas de mortalidade (Akbarshahi et al., 2012).

O processo inflamatório que ocorre no pulmão na SDRA está representado na figura abaixo (Figura 4).

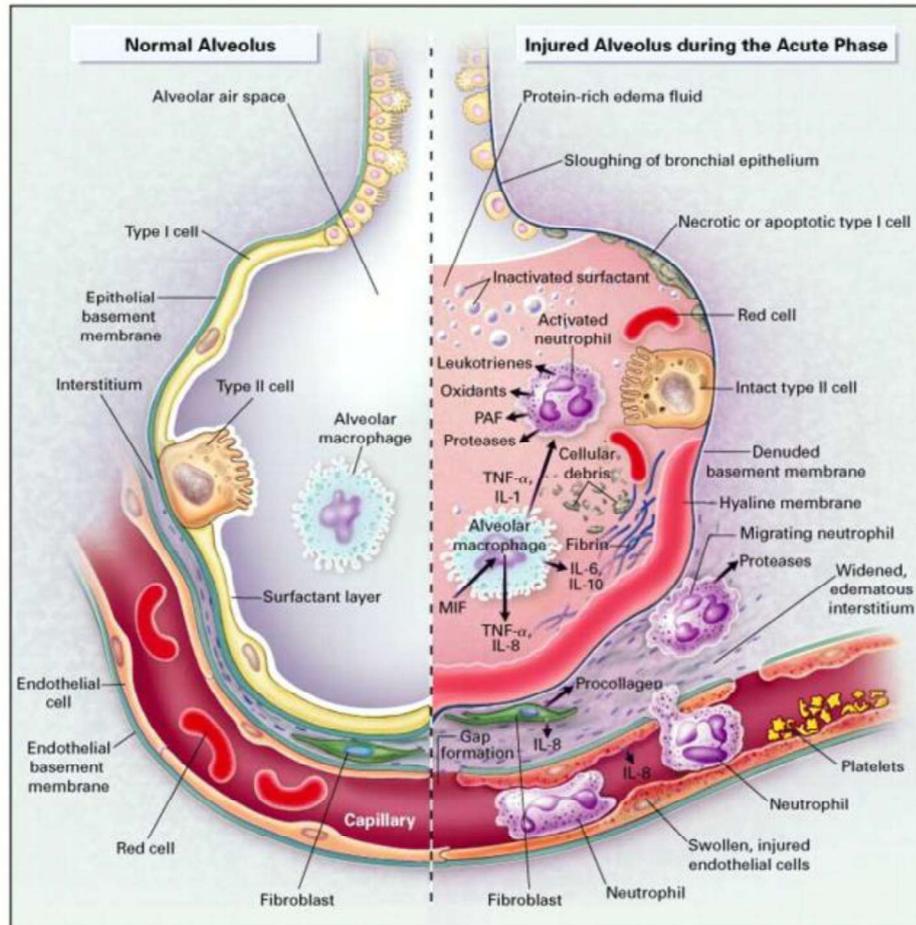


Figura 4 – Inflamação pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. Alvéolo normal (lado esquerdo) e alvéolo na condição de SDRA (lado direito). Na fase aguda da SDRA (lado direito) há uma remoção de células epiteliais no epitélio do brônquio e do alvéolo. Neutrófilos aderem no endotélio capilar e migram através do interstício para o espaço alveolar, que está preenchido com edema rico em proteína. No espaço alveolar, macrófagos alveolares secretam as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , que agem localmente estimulando a quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Os neutrófilos podem secretar ROS, proteases, leucotrienos e PAF. O influxo de edema rico em proteínas para o alvéolo leva à inativação do surfactante pulmonar. Retirado de: Ware e Matthay, 2000.

2 Justificativa

Diversos modelos animais de pancreatite aguda têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar o entendimento de processos ainda não esclarecidos e buscar novas estratégias terapêuticas para a doença. Embora os modelos experimentais terem sido importantes para responder perguntas específicas, nenhum modelo é completamente satisfatório até o momento, devido às limitações como dificuldade de desenvolver a forma grave da doença, dificuldade de reprodutibilidade, alto custo em alguns modelos, necessidade de um método invasivo em alguns casos e necessidade de métodos que não se assemelham a etiologia da doença (HueSu et al., 2006; Schneider et al., 2002). Portanto, é de grande importância a busca por novos modelos mais representativos como o do presente trabalho, que possui uma maior semelhança com a etiologia da pancreatite aguda em humanos, e que é capaz de induzir a forma mais grave da doença, possibilitando o estudo da lesão em órgão mais remotos.

Devido à importância da quimiocina CCL2 em mediar o recrutamento de macrófagos, que resulta em dano local e sistêmico, na pancreatite aguda (Kamath et al., 2016), a utilização de animais deficientes para o receptor de quimiocina CCR2 é uma excelente ferramenta para estudar o papel dos macrófagos e de possíveis alvos terapêuticos para a doença.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Padronizar um modelo experimental de pancreatite aguda alcoólica com lesão pulmonar remota e estudar o papel do receptor de quimiocinas CCR2 neste modelo.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Avaliar a inflamação pancreática e os níveis de marcadores séricos da pancreatite aguda em camundongos C57Bl/6 selvagens e deficientes para o receptor CCR2, no modelo de pancreatite aguda induzida pela administração de álcool e ácido palmitoleico;
- ii. Avaliar a inflamação pulmonar, as populações leucocitárias e a exsudação de proteínas nas vias aéreas de camundongos C57Bl/6 selvagens e deficientes para o receptor CCR2, no modelo de pancreatite aguda induzida pela administração de álcool e ácido palmitoleico;
- iii. Avaliar a presença de mediadores inflamatórios no pulmão e no soro de camundongos C57Bl/6 selvagens e deficientes para o receptor CCR2, no modelo de pancreatite aguda induzida pela administração de álcool e ácido palmitoleico;
- iv. Avaliar a mecânica pulmonar de camundongos C57Bl/6 selvagens e deficientes para o receptor CCR2, no modelo de pancreatite aguda induzida pela administração de álcool e ácido palmitoleico.

4 Materiais e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG), e camundongos machos deficientes para o receptor CCR2, que possuem como *background* camundongos C57Bl/6, obtidos inicialmente de B. Rollins (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) e reproduzidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia da UFMG. Todos os animais estavam pesando entre 20-25g e foi realizado um *n* de aproximadamente 7 animais por grupo experimental. Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos em micro isoladores de polipropileno Alesco® no biotério do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, localizado no departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro de 12 horas, além de livre acesso à água e ração. Doze horas antes a indução do modelo experimental de pancreatite aguda, os animais foram privados de comida. Todos os procedimentos foram avaliados e realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG (CEUA - UFMG) sob o protocolo 406/2015.

4.2 Pancreatite aguda induzida por álcool e ácido palmitoleico

O modelo de pancreatite aguda será estabelecido de acordo com Huang (2014), baseado na via não-oxidativa do álcool. Para a indução do modelo de pancreatite aguda foi utilizado ácido palmitoleico (POA) (Sigma-Aldrich) diluído em etanol absoluto (Sigma-Aldrich). Foi realizada uma curva dose-resposta de sobrevivência administrando etanol (1,8 g/kg) e POA, nas doses de 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg e 300 mg/kg. Nos demais experimentos foi utilizada a dose de 200 mg/kg de POA. Os camundongos foram separados em três grupos experimentais: i) Grupo salina (administração de 250 µL de salina); ii) Grupo Etanol (administração de 1,8 g/kg de etanol); Grupo POA (administração de 200 mg/kg de POA diluído em 1,8 g/kg de etanol). Esses três grupos foram feitos

tanto com animais selvagens, quanto com animais deficientes para o receptor CCR2. As administrações de etanol e POA foram realizadas com duas injeções intraperitoneais no intervalo de 1 hora. Para evitar um dano local do álcool no peritônio do camundongo, 200 µL de salina foi injetada imediatamente antes das injeções de etanol e POA. Após 24 horas, os animais foram anestesiados via subcutânea com Cetamina (130 mg/kg) e Xilazina (8.5 mg/kg), em solução salina 0,9%, e submetidos a análise da mecânica pulmonar. O sangue foi coletado na região axilar próxima ao plexo braquial e eutanasiados por exsanguinação, para coleta do lavado bronco alveolar e tecidos.

4.3 Análise da mecânica pulmonar

Os camundongos foram anestesiados com injeção subcutânea de Cetamina (130 mg/kg) e Xilazina (8.5 mg/kg), em solução fisiológica, a fim de manter a respiração espontânea sob o efeito do anestésico e, logo em seguida, foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia. Uma pequena incisão foi feita na traqueia para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina USA).

Uma vez no plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência de respiração média de 160 inspirações por minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (Vanoirbeek et al.,2010). Durante a respiração mecânica foi detectada a resistência pulmonar (RI). Para determinar a capacidade residual funcional (FRC), a ventilação foi parada ao final da expiração com um fechamento imediato da válvula localizada próximo ao tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a consequente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o FRC pela lei de Boyle. Para determinar a capacidade pulmonar total (TLC) e o volume residual (RV), foram realizadas manobras de pressão-volume quasi-

estática. Os pulmões foram inflados até uma pressão padrão de +30 cm H₂O e, então, a pressão será diminuída, lentamente, até uma pressão negativa de -30 cmH₂O, determinando a curva pressão-volume (PV), capacidade inspiratória (IC) e capacidade vital (VC). Após as manobras mecânicas, o TLC e o RV foram calculados indiretamente pelas equações $TLC = IC + FRC$ e $RV = TLC - VC$. A complacência quase-estática pulmonar na pressão de +10 cmH₂O. Todas as manobras subótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

4.4 Determinação de lipase e amilase séricas

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min a 4° C. As determinações da amilase e lipase séricas foram realizadas por método colorimétrico usando kit comercial para a determinação de amilase (Bioclin®) e de lipase (Bioclin®). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Lavado bronco alveolar

O lavado bronco alveolar (BAL) foi realizado com o objetivo de se obter leucócitos presentes no espaço alveolar. Após realizados os testes no plestimógrafo, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de cetamina/xilazina (400 µL). A traqueia exposta dos animais foi canulada com um cateter de polipropileno de 1,7mm. O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1 mL de tampão salina-fosfato estéril (PBS 1X), injetadas e recolhidas 3 vezes cada, obtendo-se aproximadamente 2,0 ml de volume final recuperado do lavado, formando um *pellet* de células que foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos. O líquido recuperado foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado para análises de detecção de proteína total. O *pellet* do BAL foi ressuspenso em 100 µL de PBS-BSA 3% e diluído 10 vezes em uma solução de Turkey. Dessa solução de

células foi colocado 10 μ L na câmara de Neubauer e, então, realizada a contagem total de leucócitos na objetiva de 40X. Para a contagem diferencial de leucócitos, lâminas foram preparadas por uma cito centrífuga (Cytospin 3, Shandon) e coradas por um kit de panótico rápido (Laborclin). As contagens diferenciais foram realizadas em microscópio óptico com a objetiva de 100X, utilizando-se óleo de imersão.

4.6 Coleta e processamento do pulmão e pâncreas

Após a realização do BAL, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS 1X pelo ventrículo direito do coração, removendo-se o sangue do leito vascular pulmonar, seguido de extração do pulmão e pâncreas. O pulmão direito foi congelado para dosagem de NAG, MPO e quimiocinas, e o pulmão esquerdo foi utilizado para realização das lâminas histológicas. Foi realizada, também, a extração do pâncreas para dosagem de NAG, MPO e análise histopatológica. Foram pesados 100 mg do pulmão e do pâncreas, e homogeneizados em 0.9 mL de uma solução para extração de citocinas e quimiocinas (NaCl 0.4 M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0.05%, 0.5% de BSA, 20 KI aprotinina), numa relação de 10% peso/volume e, posteriormente, centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi congelado e o *pellet* ressuspensado em 2 mL de tampão fosfato (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO₄, 0.015 M NaEDTA; pH 4.7) e homogeneizado; 1,5 mL de NaCl 0.2% foi adicionado e homogeneizado novamente; 1,5 mL de NaCl 1.6% com 5% de glicose foi adicionado, homogeneizado e vortexado. Após esta etapa, o volume total (1.6 mL) será dividido em dois tubos, 0.8 mL para cada tubo, para determinação de NAG e MPO. Estas amostras foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos, a uma velocidade de 10.000 rpm e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Para o ensaio de NAG, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0.8 mL de salina 0.9% com 0.1% v/v de Triton X-100, centrifugadas a 4° C, por 10 minutos a 1.500 rpm e o ensaio foi feito com o sobrenadante destas amostras. Para o ensaio de MPO, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0.8 mL de tampão fosfato (0.05 M Na₃PO₄, 0.5% HETAB; pH 5.4),

congeladas em nitrogênio líquido e então descongeladas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após esta etapa, as amostras para MPO foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante utilizado para o ensaio.

4.7 Ensaio da atividade da Mieloperoxidase tecidual

Após o processo de lise térmica realizado no nitrogênio líquido, 25 µL das amostras foram adicionadas em placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 1,6 mM e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Ao final desta etapa foi adicionado 100 µL de H₂O₂ diluído em tampão fosfato (0.05 M Na₃PO₄, 0.5% HTAB; pH 5.4), numa concentração final de 0,003%, e a placa foi novamente incubada por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, a reação foi parada pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 1M e a leitura da absorbância foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm. O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base na curva padrão de MPO, feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 2 mL de caseína 5% (dados não mostrados).

4.8 Ensaio da atividade da N-acetilglicosaminidase tecidual

A reação é iniciada pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-Dglicosaminidina (Sigma), diluídos em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.1 M, pH 4.5) na concentração final de 2.24 mM, em 100 µL de sobrenadante das amostras processadas e separadas para o ensaio em placa de 96 poços, por 10 minutos a 37° C. Ao final desta etapa, adicionou-se 100 µL de tampão glicina 0.2 M (pH 10.6) para término da reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado com base na curva padrão de NAG, feita pela coleta

de macrófagos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de tioglicolato 3% (dados não mostrados).

4.9 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas presentes no BAL foi realizada utilizando-se o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories EUA), baseado no método de Bradford. O ensaio ocorre com a adição de um corante ácido à amostra do BAL e a uma curva padrão de Albumina Bovina fração V (INLAB). Foram colocados volumes de 2 µL de cada amostra e da curva padrão, em duplicata, a uma microplaca de 96 poços (NUNC) e foram adicionados 200 µL do corante, diluído 5 vezes em água destilada, nas amostras e curva padrão. Após cerca de 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

4.10 Dosagem de quimiocinas

Os níveis das quimiocinas CXCL1 e CCL2 foram quantificados por ELISA, seguindo-se as instruções do fabricante. Microplacas de 96 poços (Nunc Maxi Sorb) foram cobertas com anticorpo de captura, na diluição recomendada pelo fabricante, em tampão carbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35 mM, NzN_3 3.1 mM; pH 9,5) e incubados overnight. Após a incubação, a placa foi lavada com PBS suplementado com 0,05% de Tween20 e, então, foi feito o bloqueio das reações inespecíficas utilizando soluções de bloqueio (PBS-BSA 1%) por 1 hora. Posteriormente, 50 µL das amostras foram pipetados e incubados overnight. Após a incubação, a placa foi lavada para retirar o excesso das amostras, e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção, nas concentrações recomendadas, por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução de estreptavidina por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução reveladora (OPD) da atividade da peroxidase por mais 30 minutos. A reação foi, então, bloqueada com a adição

de 50 μL de solução de bloqueio H_2SO_4 2N e a leitura da absorbância determinada logo em seguida em 492 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão através do software SOFTmax PRO 6.3 (Molecular Devices Corp.).

4.11 Análise histopatológica do pâncreas

Após retirada do pâncreas, as amostras são fixadas em formol a 10%, embebidas em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5 mm, com auxílio de um micrótomo, e corados com hematoxilina e eosina. As alterações morfológicas avaliadas, que são características da pancreatite, foram: edema, infiltração de células polimorfonucleares e necrose de células acinares. Os escores variam de 0 a 3 em cada uma das três características avaliadas, sendo 9 o escore total máximo (Bhatia et al., 1998; Schmidt et al., 1992). Os dados foram avaliados por meio de microscopia ótica, em um estudo cego pelo morfologista Pedro Marcos Gomes Soares, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará.

4.12 Análise estatística

Para as curvas de sobrevivência foram realizados os testes estatísticos de Log-rank (Mantel-Cox), sendo considerados significativamente diferentes os resultados com o valor de p menor que 0,05. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o test t Student não pareado. As demais análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (One-way ANOVA), com pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão média). As análises estatísticas dos dados e os gráficos foram realizados utilizando-se o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc).

5 Resultados

5.1 Padronização do modelo experimental de pancreatite aguda

5.1.1 Administração de ácido palmitotélico combinado com etanol causa letalidade nos camundongos C57Bl/6 de maneira dose-dependente

Realizamos uma curva de sobrevivência com o objetivo inicial de avaliar a letalidade dos camundongos C57Bl/6 e determinar a dose de POA/etanol a ser utilizada, bem como o tempo após indução da pancreatite aguda experimental que será utilizado para se estudar a doença. Diferentes doses de POA foram administradas via intraperitoneal e observamos os animais de 6 em 6 horas. 100% dos animais do grupo salina e etanol sobreviveram até 48 horas após a administração de POA/etanol. Os animais do grupo POA 300 tiveram 100% de letalidade após 6 horas de administração, do grupo POA 250 tiveram 100% de letalidade após 36 horas, do grupo POA 150 tiveram por volta de 50% de letalidade após 48 horas e, por último, os animais do grupo POA 200, por volta de 6 horas, 40% dos animais haviam morrido, sendo que essa letalidade foi aumentando com o tempo e, após 24 horas, 60% dos animais POA 200 morreram, alcançando 100% de letalidade após 36 horas (Figura 5). Foi observada diferença estatística entre os grupos POA nas diferentes doses com os controles ($p < 0,001$), mostrando que a administração de POA/etanol causa letalidade nos animais de maneira dose-dependente. Sendo assim, optamos por caracterizar o modelo de pancreatite aguda com a administração de POA na dose de 200 mg/kg, combinado com etanol (1,8 g/kg), eutanasiando os animais 24 horas após a indução do modelo experimental.

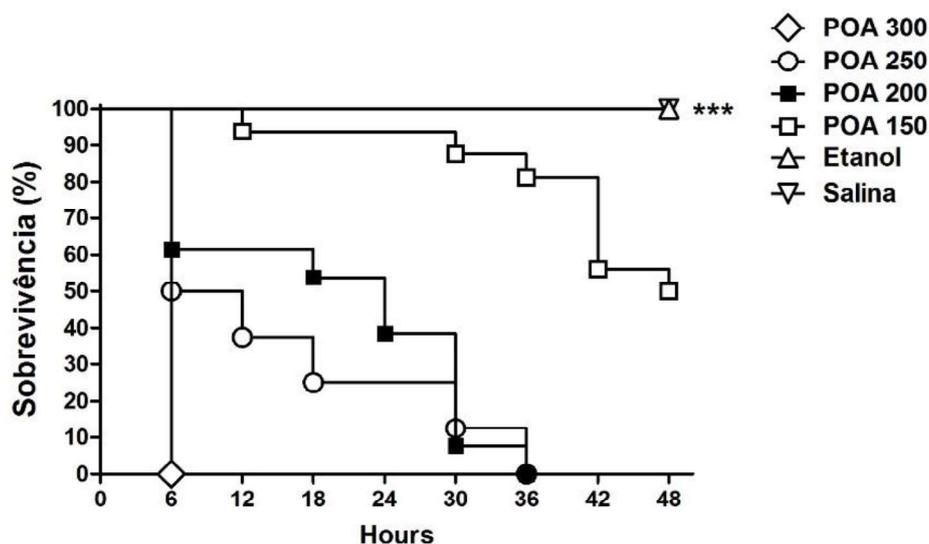


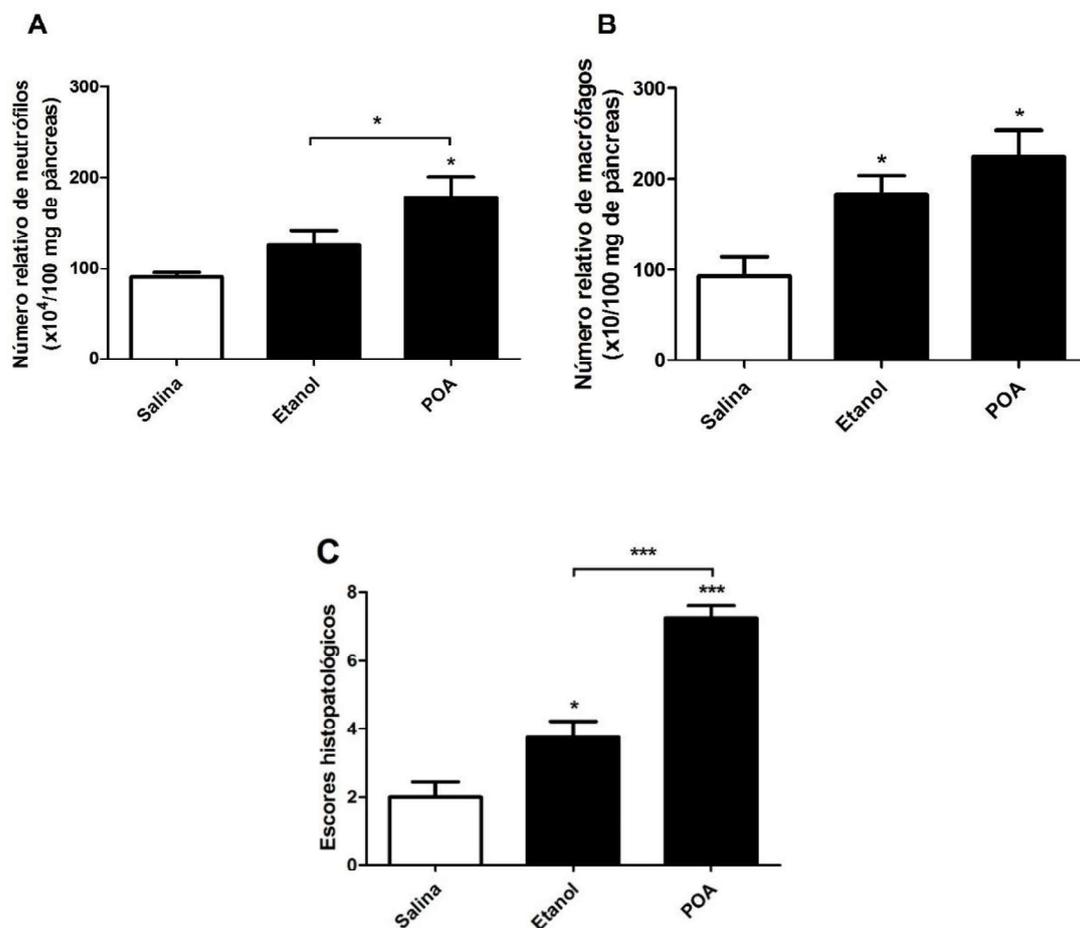
Figura 5 - Curva de sobrevivência de diferentes doses de administração de ácido palmitoleico. Após a administração *i.p.* de salina, etanol (1,8 g/kg), e POA (150, 200, 250 e 300 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg), em camundongos C57Bl/6, os animais foram observados a cada 6 horas e foi quantificada a taxa de mortalidade em 48 horas. Teste de Log-rank (Mantel-cox). *** $p < 0,001$ Salina X POA 300, POA 250, POA 200 e POA 150.

5.1.2 Administração de POA/etanol causa acúmulo de células inflamatórias e piora na avaliação histopatológica no pâncreas de camundongos C57Bl/6

Com o objetivo de avaliar a inflamação do pâncreas, quantificamos a atividade da mieloperoxidase (MPO), uma forma indireta de determinar o número de neutrófilos no tecido, e quantificamos a atividade do N-acetilglicosaminidase (NAG), uma forma indireta de determinar o número de macrófagos no tecido. O grupo POA apresentou um acúmulo de neutrófilos (Figura 6A) e macrófagos no pâncreas (Figura 6B) quando comparado com o grupo Salina, após 24 horas a indução, momento onde temos, aproximadamente, 60% de letalidade dos animais (Figura 5).

Realizamos, também, o escore histopatológico do pâncreas com base no edema, infiltrado celular e necrose de células acinares. A administração de

POA/etanol induziu uma importante alteração histopatológica no parênquima e estroma pancreático. Observamos necrose de células acinares representado por perda nuclear, e intenso infiltrado neutrofílico presente na região peri e intralobular no parênquima pancreático. No estroma pancreático, observou-se edema representado pelo espaçamento entre os ácinos pancreáticos. A lesão pancreática se estendia por mais de 50% do órgão e ocorria de maneira difusa, que pode ser observada pela piora no escore histopatológico dos animais POA (Figura 6C) quando comparados com os animais dos grupos Salina e Etanol, com representação das micrografias nas figuras 6D-6I.



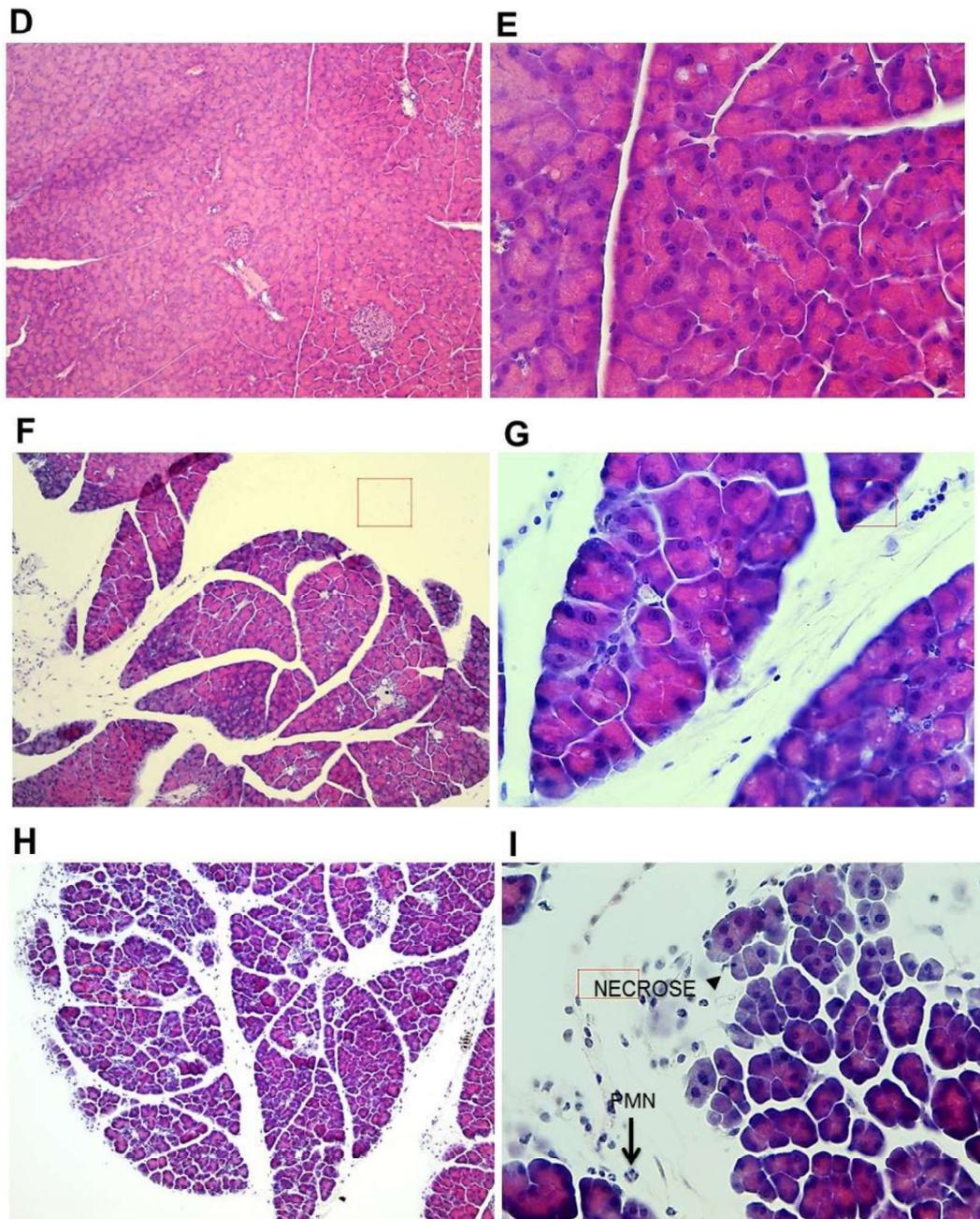


Figura 6 – Inflamação pancreática no modelo de pancreatite aguda induzida por POA/etanol em camundongos C57Bl/6. Após a administração *i.p.* de salina, etanol (1,8 g/kg), e POA (200 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg), em camundongos C57Bl/6, quantificamos a atividade da enzima de MPO (A) e NAG (B), além de realizar o escore histológico (C) das amostras de pâncreas. Cortes histológicos representativos de seções do pâncreas dos grupos Salina (D, E), Etanol (F, G) e POA (H, I). Do lado esquerdo, as micrografias estão no aumento de 100X e do lado direito aumento de 400X. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.1.3 Administração de POA/etanol resulta em aumento dos marcadores séricos da pancreatite e de quimiocinas importantes na resposta inflamatória sistêmica em camundongos C57Bl/6

Após 24 horas das administrações *i.p.* de POA (200 mg/kg) e etanol (1,8 g/kg) nos camundongos C57Bl/6, avaliamos o nível de amilase e lipase séricas, marcadores clássicos da pancreatite aguda. Observamos um aumento tanto de amilase (Figura 7A) quanto de lipase (Figura 7B), tanto em relação ao grupo salina quanto em relação ao grupo etanol.

Com o objetivo de avaliar se houve uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, avaliamos os níveis séricos das quimiocinas CXCL1 e CCL2, moléculas importantes que no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, e que são indicadores de inflamação sistêmica e gravidade da pancreatite aguda. Observamos um aumento das quimiocinas CXCL1 (Figura 7C) e CCL2 (Figura 7D) no soro dos animais WT POA quando comparados com seus controles.

Com esses resultados obtidos no pâncreas e soro dos animais, podemos concluir que houve a indução da pancreatite aguda experimental, com uma possível resposta inflamatória sistêmica exacerbada, devido aos elevados níveis das quimiocinas CXCL1 e CCL2.

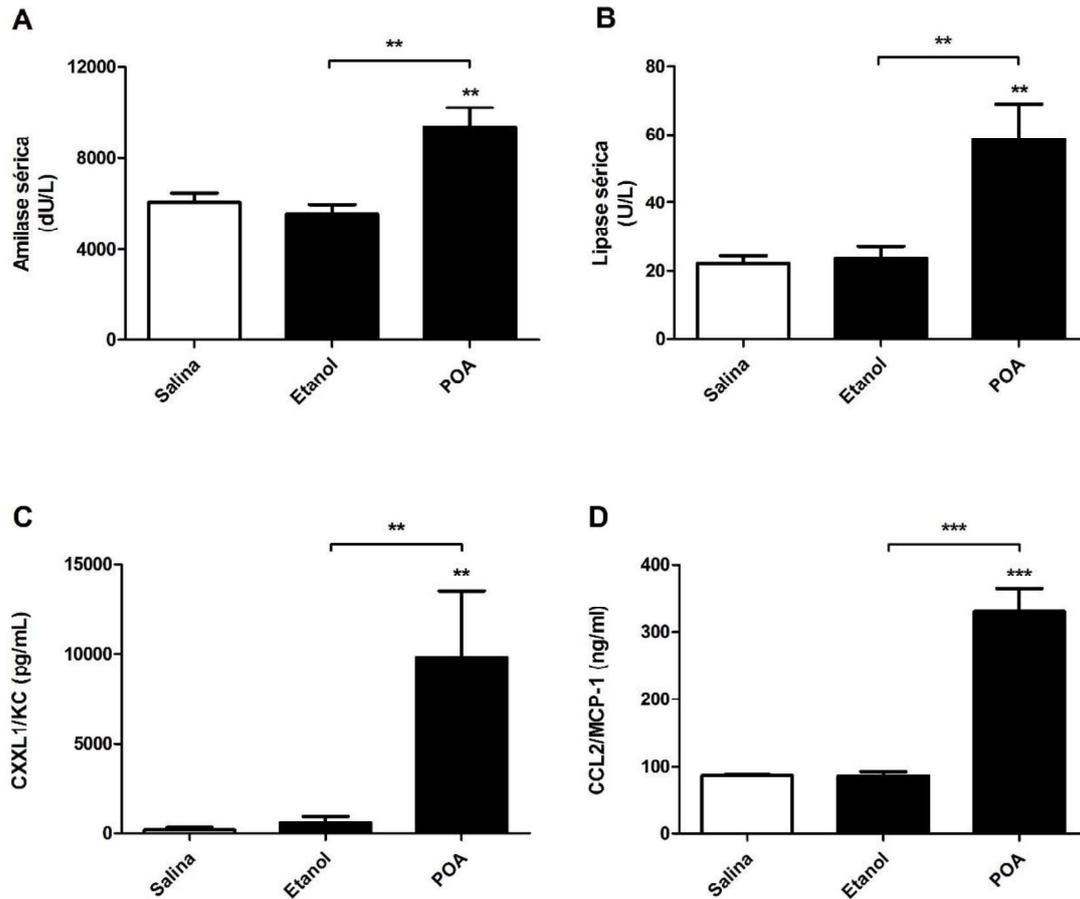


Figura 7 – Níveis séricos de marcadores da pancreatite e de quimiocinas no modelo de pancreatite aguda induzida por POA/etanol em camundongos C57Bl/6. Após a administração *i.p.* de salina, etanol (1,8 g/kg), e POA (200 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg), em camundongos C57Bl/6, quantificamos amilase (A), lipase (B), CXCL1 (C) e CCL2 (D) no soro dos animais. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2 Lesão pulmonar associada à pancreatite aguda experimental em camundongos C57Bl/6

5.2.1 A indução da pancreatite aguda experimental causa recrutamento de leucócitos e exsudação de proteínas para as vias aéreas

Após a indução do modelo experimental de pancreatite com uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, nós investigamos os aspectos inflamatórios no pulmão com o objetivo de estudar a lesão pulmonar associada à pancreatite aguda. A partir do lavado bronco alveolar, realizamos a contagem total e diferencial de leucócitos e, com isso, observamos um aumento no número de leucócitos totais (Figura 8A) nos animais WT POA quando comparados com o grupo controle. Esse recrutamento de leucócitos para as vias aéreas foi, principalmente, de macrófagos (Figura 8B) e neutrófilos (Figura 8C).

Dosamos o nível de proteínas totais no lavado bronco alveolar pelo método de Bradford e constatamos um aumento na exsudação de proteínas nos animais WT POA quando comparados com os animais do grupo Salinas (Figura 8E).

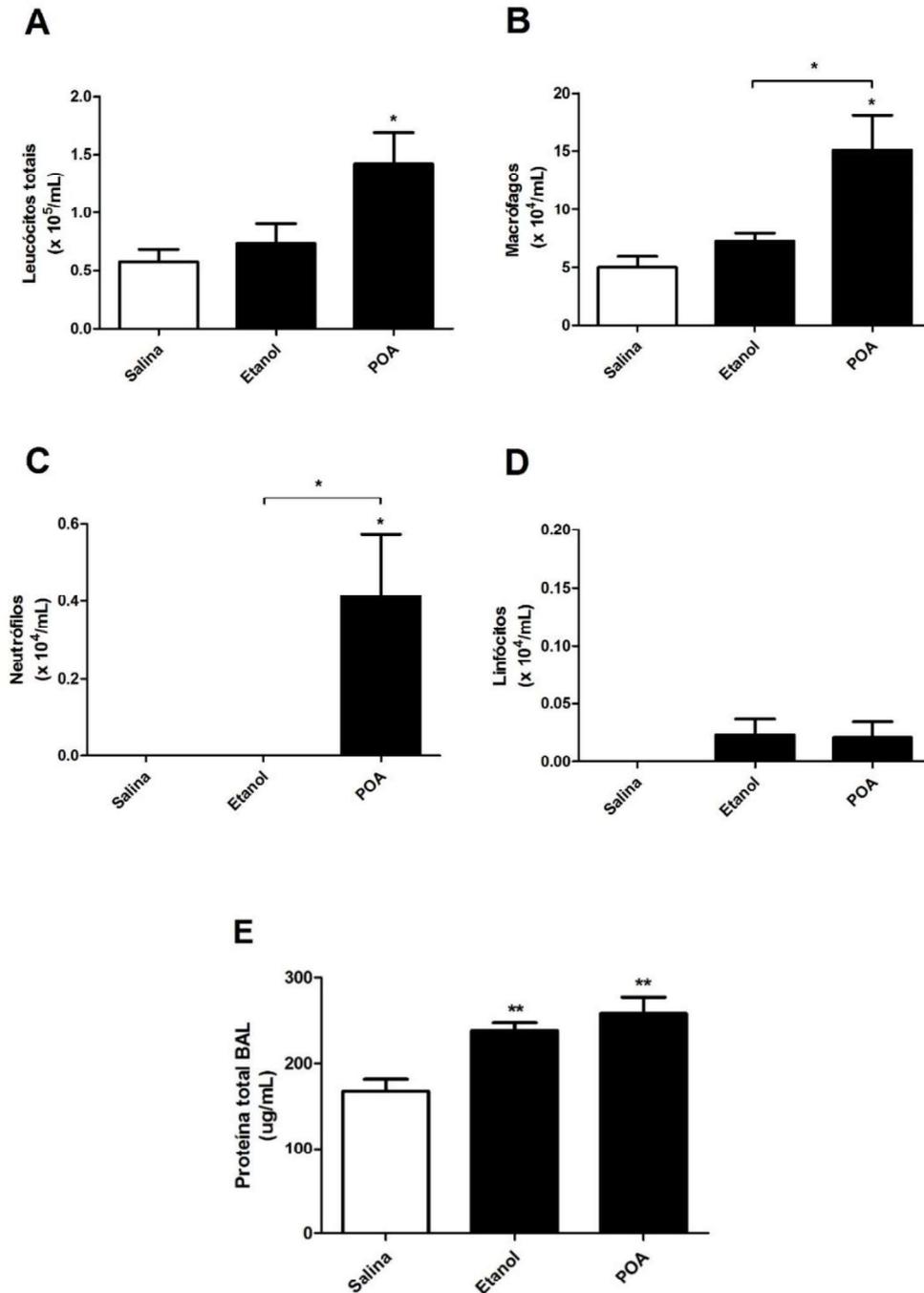
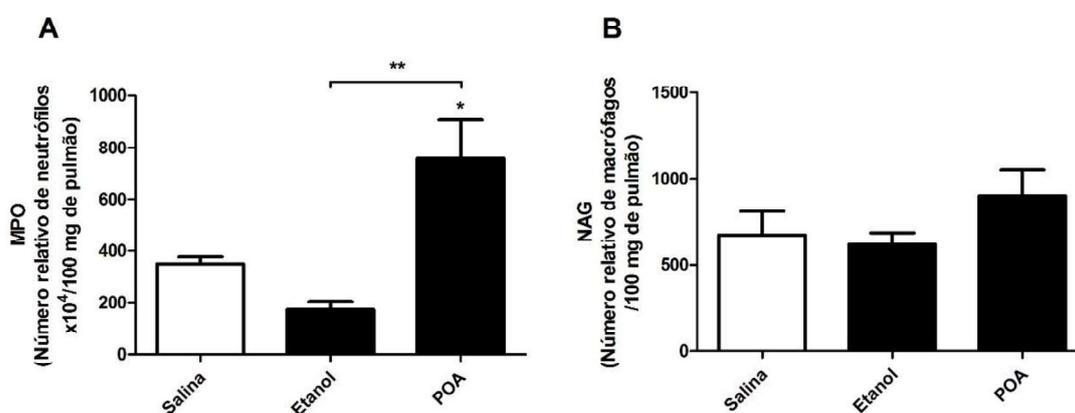


Figura 8 – Recrutamento de leucócitos e exsudação de proteínas para as vias aéreas de camundongos C57Bl/6. Foi realizado o lavado bronco alveolar de camundongos C57Bl/6 e realizada a contagem total (A) e diferencial de leucócitos, diferenciando macrófagos (B), neutrófilos (C) e linfócitos (D). A exsudação de proteínas foi avaliada pelo método de dosagem de proteínas totais de Bradford (E) no lavado bronco alveolar. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2 A indução da pancreatite aguda experimental causa um recrutamento de neutrófilos, aumento das quimiocinas CXCL1 e CCL2, e aumento de células inflamatórias no pulmão dos camundongos C57Bl/6

Foi realizada a quantificação de MPO e NAG no tecido pulmonar, para mensuração indireta de macrófagos e neutrófilos, respectivamente, no órgão, e pudemos observar um acúmulo de neutrófilos no pulmão dos animais WT POA comparados com seus controles (Figura 9A), mas não de macrófagos (Figura 9B). Além disso, dosamos os níveis das quimiocinas CXCL1 e CCL2 no pulmão dos animais e observamos um aumento de ambas quimiocinas no grupo POA comparadas com o grupo controle (Figura 9C-9D).

Micrografias do pulmão no aumento de 400X foram tiradas para representar a inflamação pulmonar, podendo ser observado um maior número de células inflamatórias, espessamento alveolar e edema no grupo POA (Figura 9G) comparado com seus controles (Figura 9E-9F).



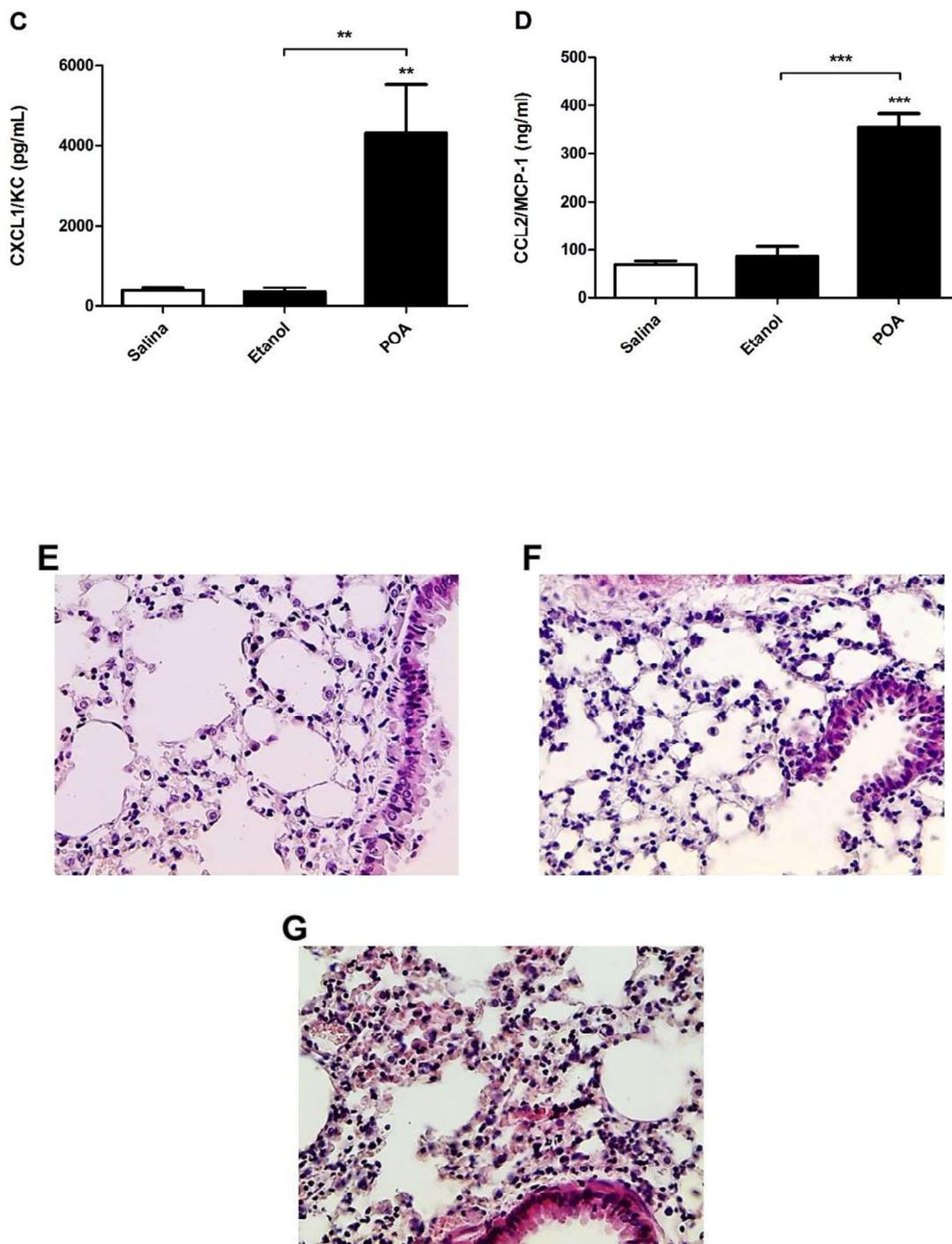


Figura 9 – Nível de quimiocinas, leucócitos e inflamação no pulmão de camundongos C57Bl/6. Foi quantificada a atividade da enzima MPO (A), NAG (B), os níveis das quimiocinas CXCL1 (C) e CCL2 (D), pelo método de ELISA, e micrografias representativas do pulmão no aumento de 400X, dos grupos Salina (E), Etanol (F) e POA (G), em camundongos C57Bl/6. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.3 A indução da pancreatite aguda experimental causa uma piora na mecânica pulmonar dos animais C57Bl/6

Além de avaliar os aspectos inflamatórios pulmonares, também avaliamos a mecânica pulmonar nos animais. Observamos uma piora nos aspectos da mecânica pulmonar, com redução de volumes pulmonares, observados pela capacidade pulmonar total (TLC) (Figura 10A), capacidade residual funcional (FRC) (Figura 10B), capacidade inspiratória (IC) (Figura 10C) e volume residual (RV) (Figura 10D) nos animais do grupo POA comparados com seus controles. Foi observado aumento das forças elásticas pulmonares avaliadas pela perda de complacência quasi-estática (Figura 10E), e aumento de resistência pulmonar (RI) (Figura 10F), nos animais do grupo POA comparados com seus controles, que pode ser consequência de edema intersticial e alveolar, e acúmulo de líquido nas vias aéreas nos camundongos C57Bl/6. Por fim, observamos pela curva Pressão-Volume (PV), que os animais do grupo POA apresentaram perda de espaço alveolar, com volume reduzido tanto nas pressões negativas quanto nas positivas (Figura 10G).

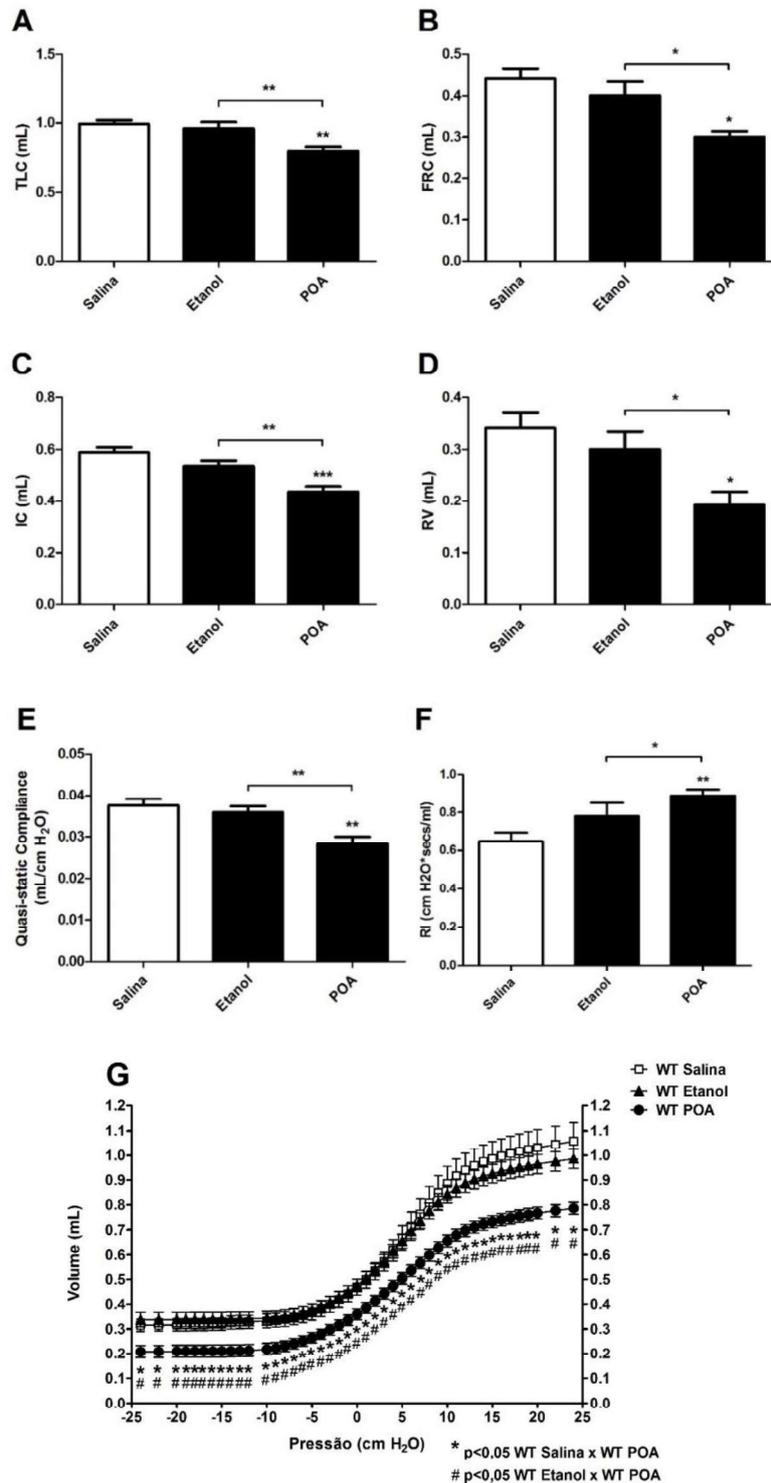


Figura 10 – Mecânica pulmonar de camundongos C57Bl/6. Foi realizada a espirometria dos camundongos C57Bl/6 e obtidos os valores de capacidade total pulmonar (A), capacidade funcional residual (B), capacidade inspiratória (C), volume residual (D), complacência Quasi-estática (E), resistência pulmonar (F) e curva pressão-volume (G). Valores expressos como média ± EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.3 Investigação da pancreatite aguda em camundongos deficiente para o receptor de quimiocinas CCR2

5.3.1 Animais deficientes para o receptor CCR2 são protegidos da letalidade causada pela pancreatite aguda experimental

Dada a importância dos macrófagos no desenvolvimento da pancreatite aguda e de lesão pulmonar, utilizamos o mesmo modelo experimental de pancreatite em camundongos deficientes para o receptor CCR2 (CCR2^{-/-}). Foi realizada uma curva de sobrevivência dos animais CCR2^{-/-} e observamos proteção na letalidade comparado com o grupo WT POA. Após 24 horas de indução do modelo experimental, os animais WT POA tiveram por volta de 60% de letalidade enquanto os animais CCR2^{-/-} POA tiveram apenas 20%. Em um tempo mais tardio, 100% dos animais WT POA morreram após 36 horas e apenas 40% dos animais CCR2^{-/-} do grupo POA morreram após esse mesmo tempo. Quando comparamos os grupos WT POA e CCR2^{-/-} POA também observamos diferença estatística entre os grupos, confirmando uma proteção da letalidade causada pela pancreatite aguda experimental nestes animais (Figura 11).

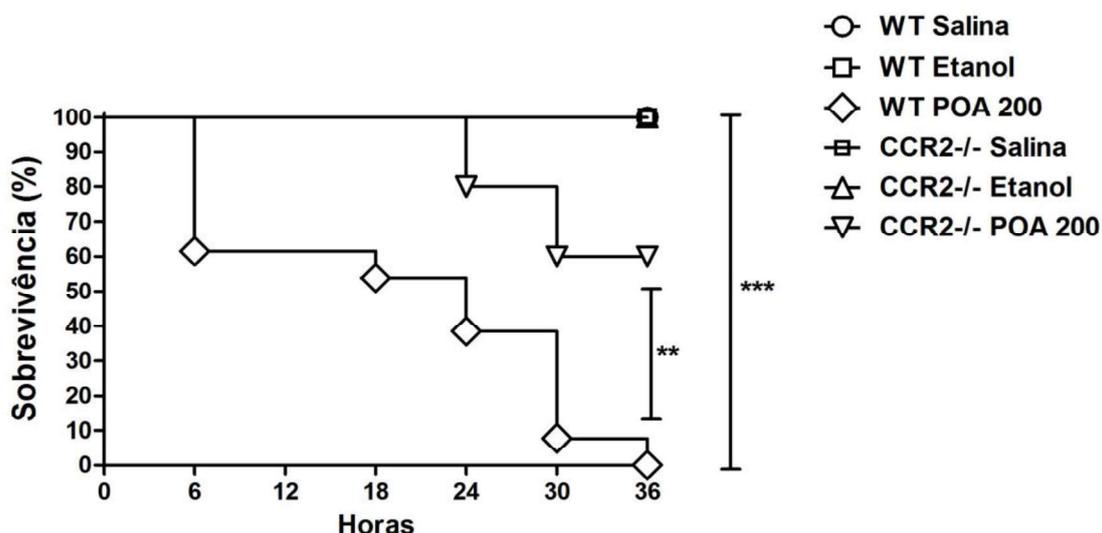


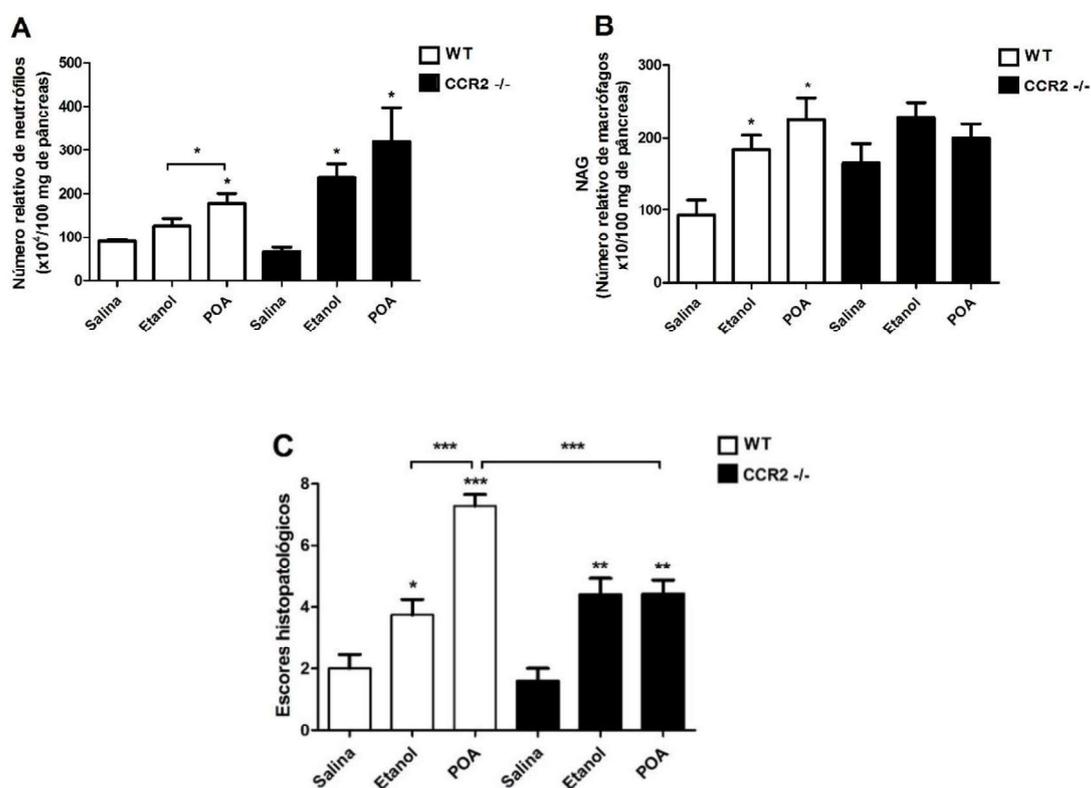
Figura 11 – Curva de sobrevivência da administração de POA/etanol em camundongos WT e CCR2^{-/-}. Após a administração *i.p.* de salina, etanol (1,8 g/kg), e POA (200 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg), em camundongos WT e CCR2^{-/-}, os animais foram observados a cada 6 horas e foi quantificada a taxa de mortalidade em 36 horas. Teste de Log-rank (Mantel-cox). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.2 Animais deficientes para o receptor CCR2 possuem redução no acúmulo de macrófagos e melhora na histopatologia do pâncreas

Ao avaliar a atividade das enzimas NAG e MPO, não observamos um acúmulo de macrófagos no pâncreas dos animais CCR2^{-/-} (Figura 12B) quando comparados com o grupo Salina. Apesar disso, assim como nos animais WT POA, há infiltrado de neutrófilos no órgão (Figura 12A).

Ao realizar o escore histopatológico do pâncreas, observamos uma proteção no tecido pancreático dos animais CCR2^{-/-} POA quando comparados com o grupo WT POA, com a melhora do escore (Figura 12C), com menos infiltrado celular e necrose acinar que pode ser observado nas figuras 12D-12I.

Em conjunto, esses resultados indicam que houve uma redução da inflamação pancreática nos animais deficientes para o receptor CCR2, após a administração de POA/etanol, apesar dessa proteção não ter sido por completa, visto que há um recrutamento de neutrófilos para o tecido.



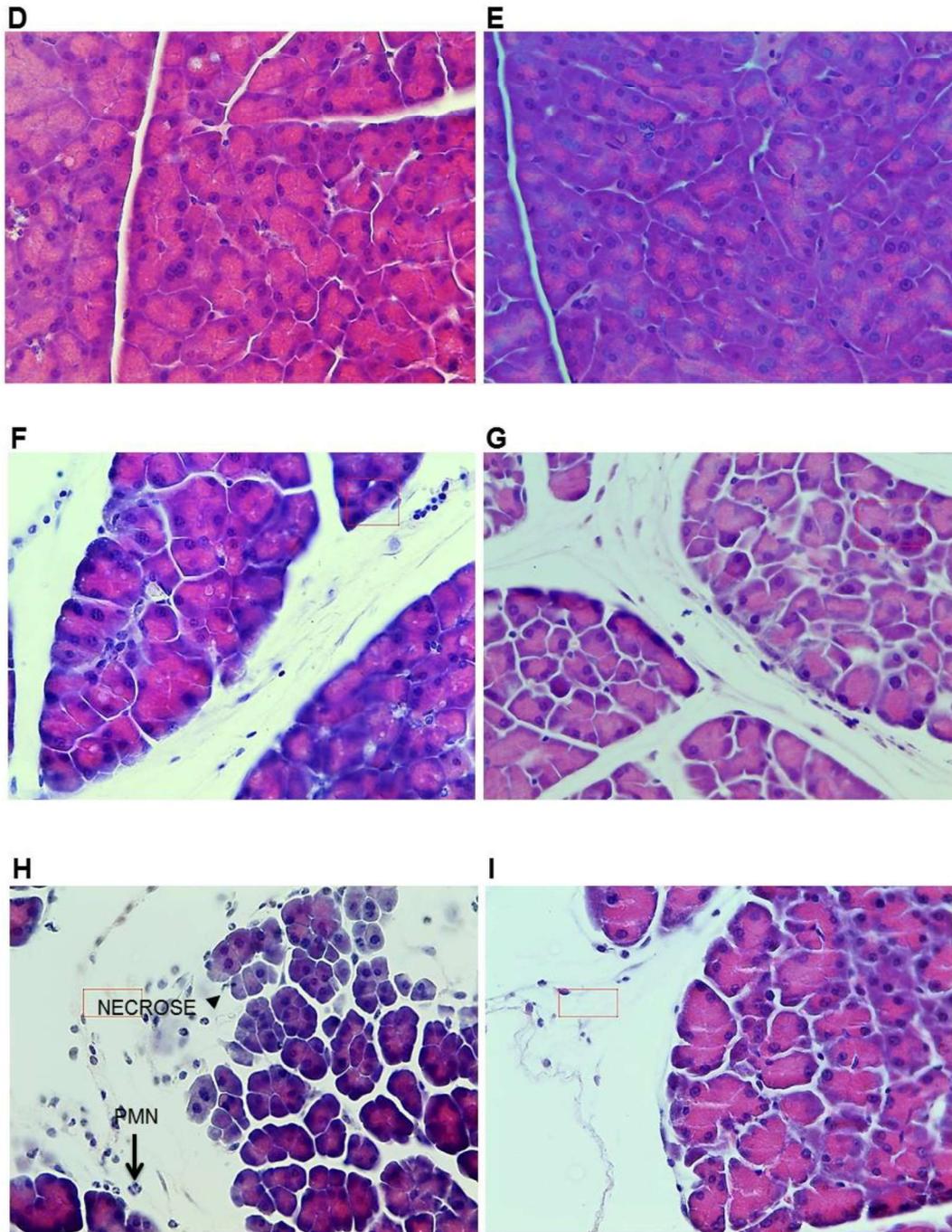


Figura 12 - Inflamação pancreática em camundongos WT e CCR2^{-/-}. Após a administração *i.p.* de salina, etanol (1,8 g/kg) e POA (200 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg), nos animais WT e CCR2^{-/-}, quantificamos a atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B), além de realizar o escore histológico (C) das amostras de pâncreas. Cortes histológicos representativos de seções do pâncreas dos grupos Salina (D, E), Etanol (F, G) e POA (H, I). Do lado esquerdo, as micrografias pertencem aos animais WT e do lado direito aos animais CCR2^{-/-} no aumento de 400X. Valores expressos como média

± EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.3.3 Animais deficientes para o receptor CCR2 não possuem biomarcadores de pancreatite elevados e os níveis séricos de CXCL1 são reduzidos .

Após 24 horas da administração intraperitoneal de POA/etanol nos animais CCR2^{-/-}, observamos que a indução do modelo experimental nesses animais não foi capaz de aumentar os níveis séricos de amilase (Figura 13A) e lipase (Figura 13B), indicando uma proteção do pâncreas nesses animais quando comparados com os animais WT POA.

Ao avaliar as quimiocinas CXCL1 e CCL2, pelo método de ELISA, observamos redução nos níveis da quimiocina CXCL1 no soro dos animais CCR2^{-/-} comparados com animais WT (Figura 13C). Porém, os níveis da quimiocina CCL2 permaneceram altos quando comparamos estes dois grupos (Figura 13D).

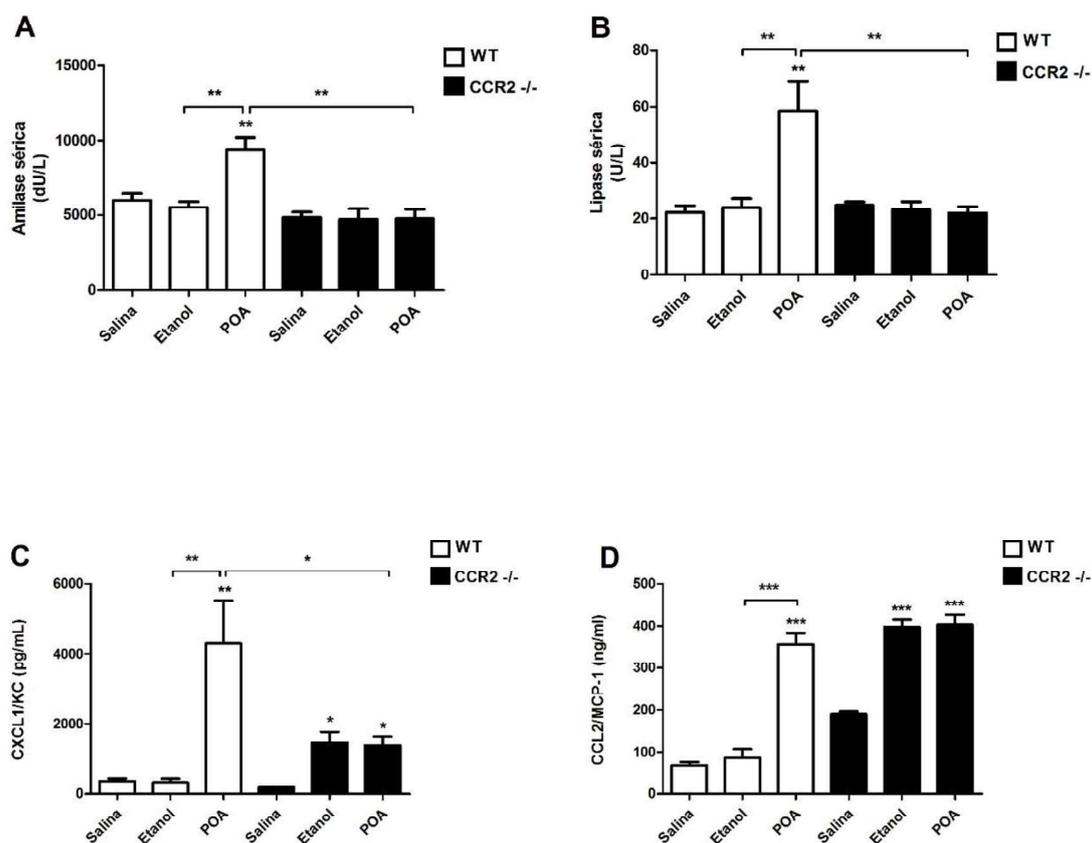


Figura 13 – Níveis séricos de marcadores da pancreatite e de quimiocinas em camundongos WT e CCR2^{-/-}. Após a administração *i.p.* de salina, etanol (1,8 g/kg) e POA (200 mg/kg) combinado com etanol (1,8 g/kg), nos animais WT e CCR2^{-/-}, quantificamos os níveis séricos de amilase (A) e lipase (B). Também quantificamos por ELISA os níveis das quimiocinas CXCL1 (C) e CCL2 (D) no soro dos animais. Valores expressos como média ± EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.4 Estudo da lesão pulmonar associada à pancreatite aguda em camundongos deficientes para o receptor de quimiocina CCR2

5.4.1 A indução da pancreatite aguda experimental causa uma mudança nas populações leucocitárias nas vias aéreas e redução da exsudação de proteínas nos animais deficientes para o receptor CCR2

A partir do lavado bronco alveolar, realizamos a contagem total e diferencial de leucócitos e, com isso, observamos um aumento no número de leucócitos totais (Figura 14A) tanto nos grupos WT POA quanto CCR2^{-/-} POA, quando comparadas com os grupos controles. Porém, ao contrário dos animais WT POA que o recrutamento foi, principalmente, de macrófagos (Figura 14B) e neutrófilos (Figura 14C), nos animais CCR2^{-/-} POA foi principalmente de linfócitos (Figura 14D), e em menor número de macrófagos (Figura 14B) e neutrófilos (Figura 14C).

Dosamos o nível de proteínas totais no lavado bronco alveolar pelo método de Bradford e constatamos que o aumento da exsudação de proteínas para as vias aéreas é evitado nos animais CCR2^{-/-} POA (Figura 14E).

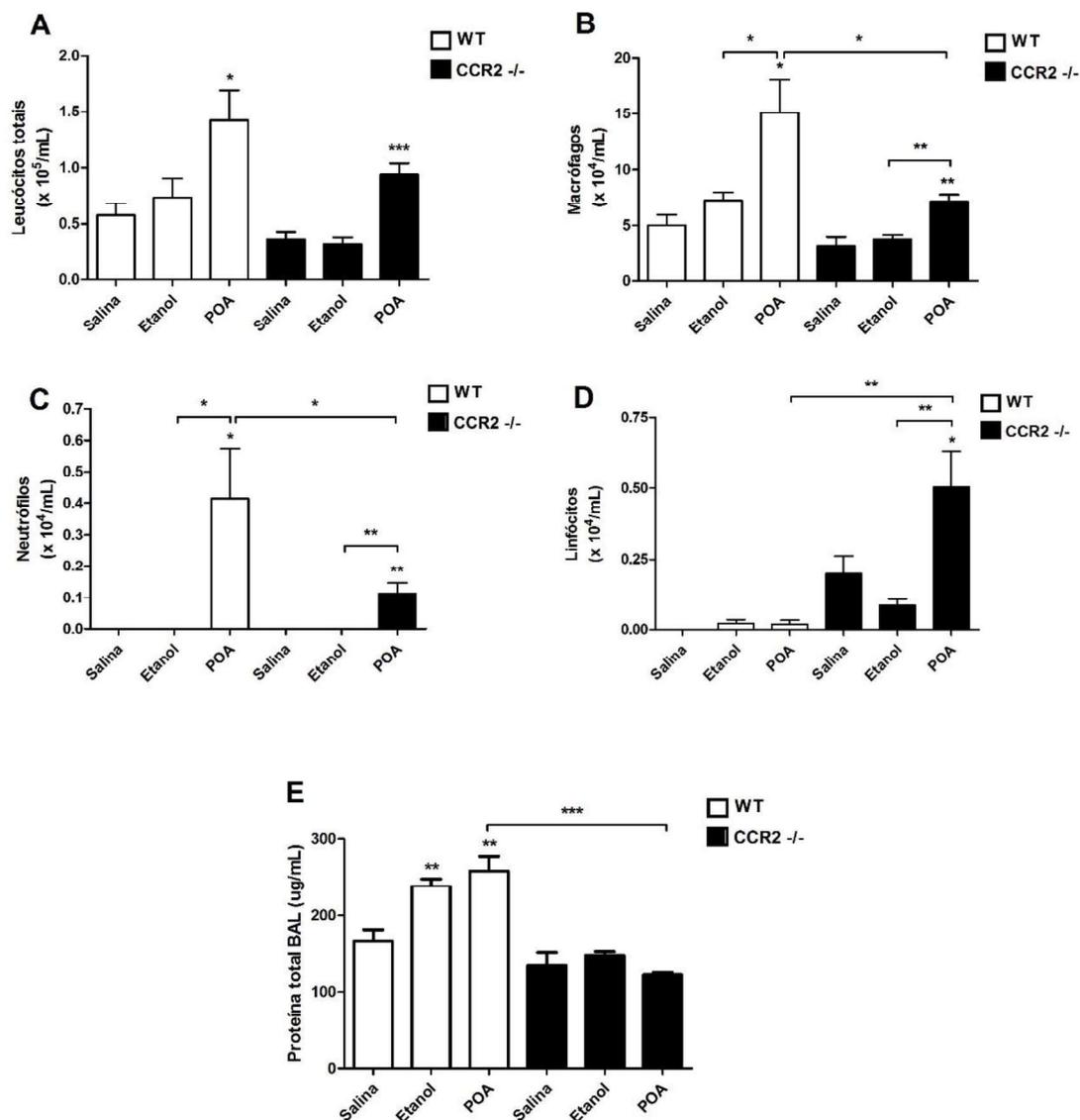


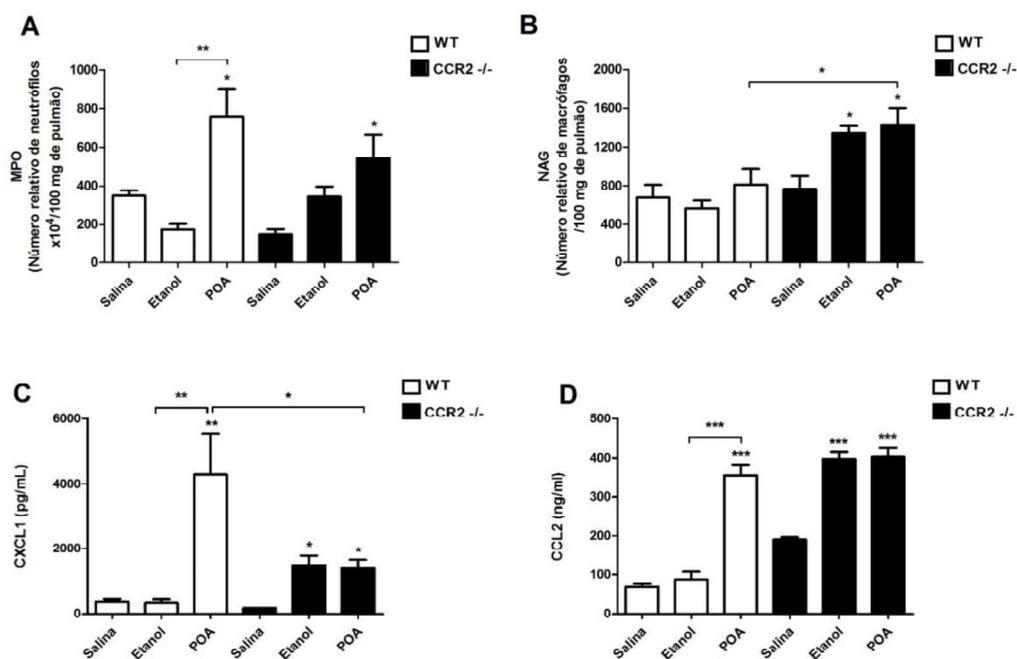
Figura 14 – Recrutamento de leucócitos e exsudação de proteínas para as vias aéreas em camundongos WT e CCR2^{-/-} Foi realizado o lavado bronco alveolar e realizada a contagem total de leucócitos (A), contagem diferencial de leucócitos, diferenciando macrófagos (B), neutrófilos (C) e linfócitos (D), de camundongos WT e CCR2^{-/-}. A exsudação de proteínas foi avaliada pelo método de dosagem de proteínas totais de Bradford (E) no lavado bronco alveolar. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.4.2 Animais deficientes para o receptor CCR2 possuem níveis reduzidos de CXCL1 e acúmulo de macrófagos no pulmão

Foi realizada a quantificação de MPO e NAG no tecido pulmonar, para mensuração indireta de macrófagos e neutrófilos, respectivamente, no órgão. Não observamos uma diminuição no acúmulo de neutrófilos no pulmão dos animais CCR2^{-/-} POA comparados com os animais WT POA (Figura 15A). Além disso, observamos um acúmulo de macrófagos apenas no pulmão dos animais CCR2^{-/-} POA (Figura 15B).

Além disso, dosamos os níveis das quimiocinas CXCL1 e CCL2, pelo método de ELISA, no pulmão dos animais, e observamos uma redução dos níveis de CXCL1 no grupo CCR2^{-/-} POA quando comparado com o grupo WT POA (Figura 15C). Porém, também encontramos níveis elevados de CCL2 quanto nos animais CCR2^{-/-} POA (Figura 15D).

Micrografias do pulmão dos camundongos, no aumento de 400X, foram tiradas para representar a inflamação pulmonar, podendo ser observado um maior número de células inflamatórias, espessamento alveolar e edema no grupo WT POA (Figura 9I) quando comparamos com animais CCR2^{-/-} POA (Figura 9J).



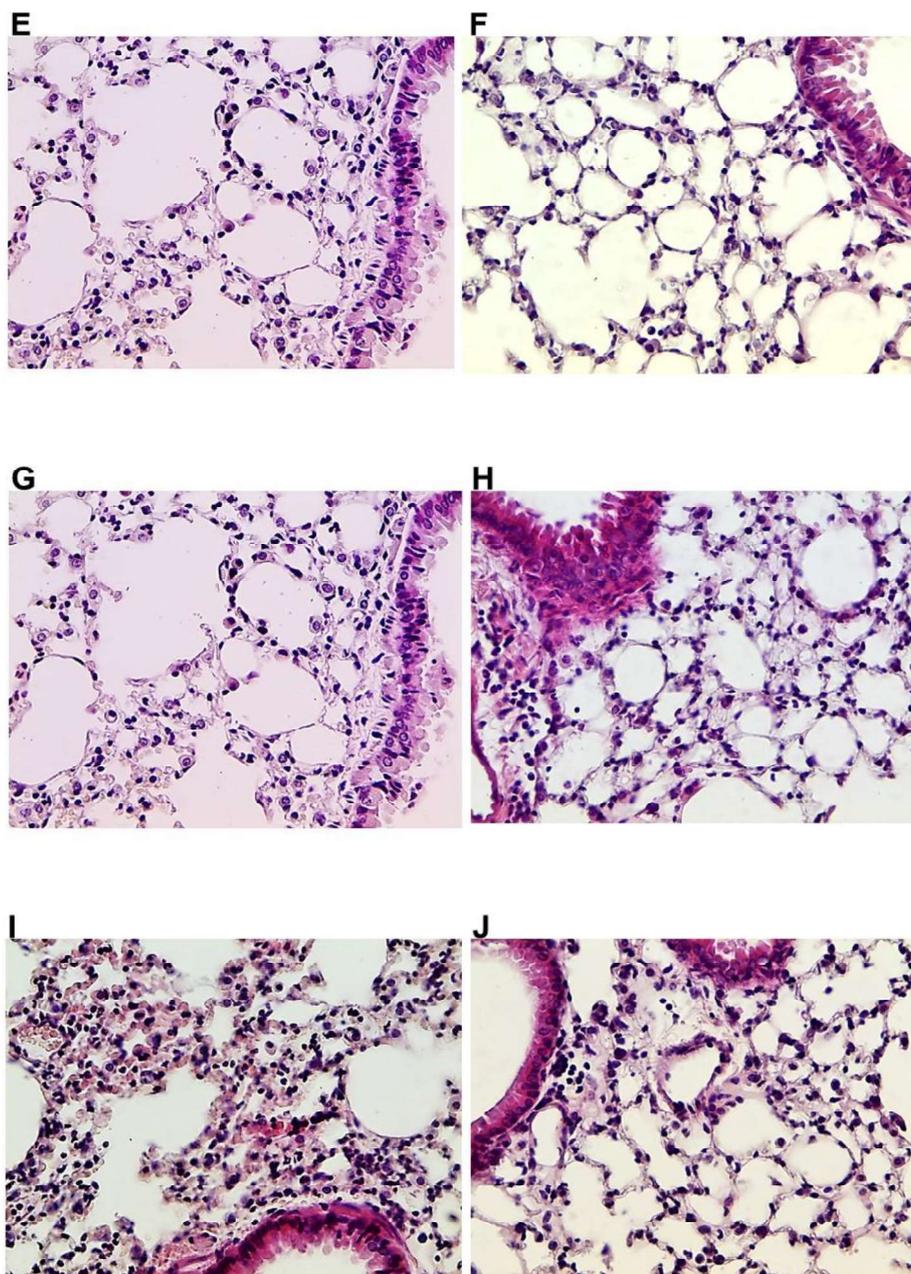
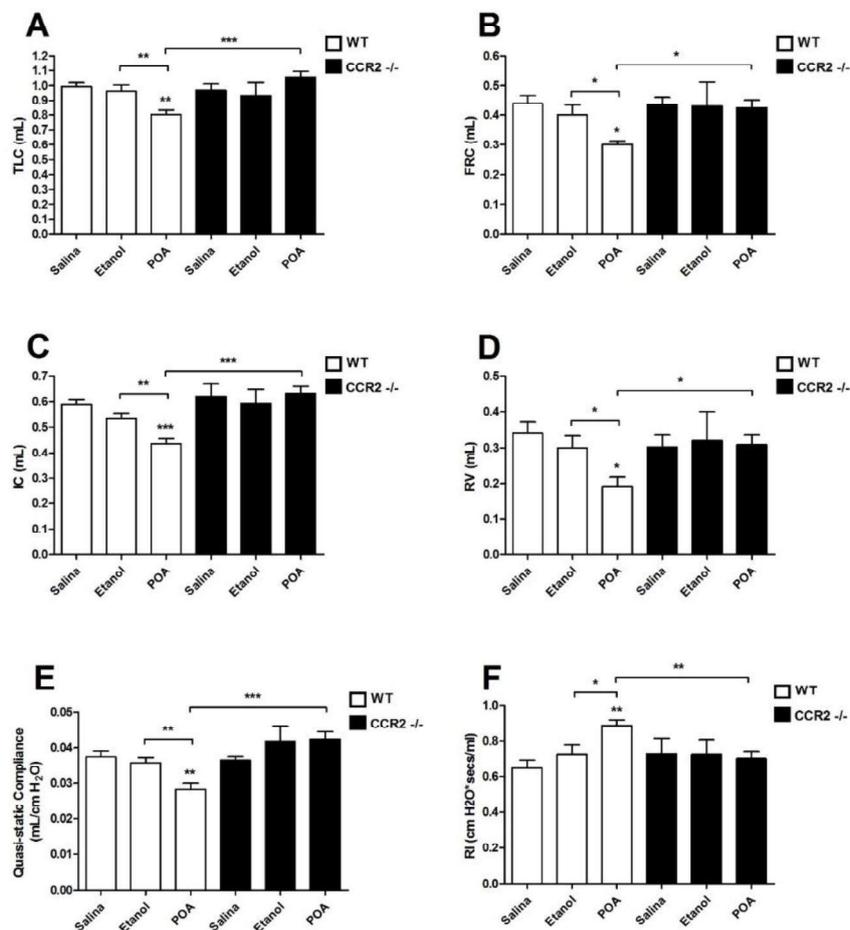


Figura 15 – Níveis de quimiocinas, leucócitos e inflamação no pulmão de camundongos WT e CCR2^{-/-}. Foi quantificada a atividade da enzima MPO (A), NAG (B), e os níveis das quimiocinas CXCL1 (C) e CCL2 (D), pelo método de ELISA, e micrografias representativas do pulmão no aumento de 400X, dos grupos Salina (E, F), Etanol (G, H) e POA (I, J), em camundongos WT e CCR2^{-/-}. As micrografias do lado esquerdo pertencem aos animais WT e do lado direito aos animais CCR2^{-/-}. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.4.3 Animais deficientes para o receptor CCR2 são protegidos da piora da função pulmonar causada pela pancreatite aguda experimental

Ao avaliar a mecânica pulmonar dos animais CCR2^{-/-}, observamos uma proteção da perda de função pulmonar, em todos os parâmetros avaliados, quando comparados com animais WT POA. Os parâmetros avaliados foram capacidade pulmonar total (TLC) (Figura 16A), capacidade residual funcional (FRC) (Figura 16B), capacidade inspiratória (IC) (Figura 16C), volume residual (RV) (Figura 16D), complacência quasi-estática (Figura 16E), e resistência pulmonar (RI) (Figura 16F). Analisamos, também, a curva pressão-volume (PV) (Figura 16G) e observamos que animais CCR2^{-/-} POA são protegidos da perda de volume tanto nas pressões negativas quanto nas positivas. Esses dados indicam que a indução do nosso modelo de pancreatite pode ter causado uma lesão pulmonar de maior intensidade apenas nos animais WT POA, com edema intersticial e alveolar, e acúmulo de líquido nas vias aéreas, enquanto os animais CCR2^{-/-} POA foram protegidos em todos os parâmetros avaliados.



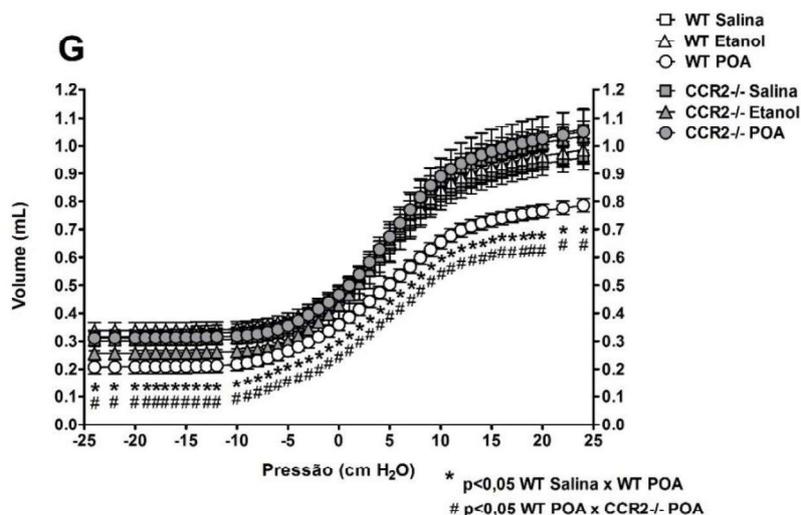


Figura 16 – Mecânica pulmonar dos camundongos WT e CCR2-/-. Foi realizada a espirometria dos animais WT e CCR2-/-, e obtidos os valores de capacidade total pulmonar (A), capacidade funcional residual (B), capacidade inspiratória (C), volume residual (D), complacência quasi-estática (E), resistência pulmonar (F) e curva pressão-volume (G). Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.5 Sumário dos resultados

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, podemos sumarizar:

- A administração de diferentes doses de ácido palmítico (POA) combinado com etanol causa letalidade em camundongos C57Bl/6 de maneira dose-dependente.

- A dose escolhida para a caracterização do modelo experimental de pancreatite aguda foi de 200 mg/kg de POA combinado com 1,8 g/kg de etanol, que resultou em lesão pancreática com acúmulo de neutrófilos e macrófagos no pâncreas de camundongos C57Bl/6.

- A indução da pancreatite aguda experimental causou aumento de lipase, amilase, CXCL1 e CCL2 no soro de camundongos C57Bl/6.

- A indução da pancreatite aguda experimental resultou em lesão pulmonar, com aumento de células inflamatórias, quimiocinas e piora na função pulmonar em camundongos C57Bl/6.

- Animais deficientes para o receptor de quimiocinas CCR2 (CCR2^{-/-}) são protegidos da letalidade, quando comparados com animais C57Bl/6 selvagens (WT), induzida pelo nosso modelo experimental.

- Animais CCR2^{-/-} POA apresentam menor lesão pancreática e baixos níveis de lipase e amilase, além níveis reduzidos da quimiocina CXCL1 no soro quando comparados com animais WT.

- Animais CCR2^{-/-} apresentaram uma proteção contra a lesão pulmonar remota, além de uma mudança no perfil leucocitário no pulmão, com menor exsudação de proteínas e níveis de CXCL1, além da função pulmonar preservada.

6 Discussão

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória do pâncreas, que dependendo da gravidade pode afetar órgãos remotos, como o pulmão. Representa um importante problema de saúde, pois possui considerável taxa de morbidade e mortalidade. Não possui tratamento específico, e sua patogênese e os aspectos fisiopatológicos não estão completamente esclarecidos (Gukovsky et al., 2012; Pandol et al., 2007).

Padronizamos, em nosso laboratório, um modelo experimental semelhante ao modelo proposto por Huang e colaboradores (2014) em camundongos C57Bl/6, com o objetivo de estudar a lesão pulmonar associada à pancreatite aguda. Optamos por padronizar o modelo experimental com a dose de 200 mg/kg de POA e 1,8 mg/kg de etanol, que se mostrou bem agressiva, causando 60% nos animais após 24 horas e 100% de letalidade após 36 horas de indução. Esse modelo experimental se mostrou interessante pelo fato de se relacionar com a etiologia da pancreatite aguda e possibilidade de aumentar a gravidade da doença, modificando as doses de administrações.

Após 24 horas de indução do nosso modelo experimental foi realizada a eutanásia dos animais e, observamos o aumento de amilase no soro e infiltrado de neutrófilos no pâncreas. Esses dados corroboram com os resultados encontrados no trabalho de Huang e colaboradores (2014). Além disso, também encontramos um aumento de lipase no soro e infiltrado de macrófagos no pâncreas. As dosagens de lipase e amilase séricas são os exames para diagnósticos de pancreatite aguda mais utilizados (Guimarães et al., 2009). A presença de infiltrado inflamatório no pâncreas, principalmente por neutrófilos, e necrose acinar é característica marcante da doença (Banks e Freeman, 2006), confirmando a indução do modelo de pancreatite aguda experimental em nosso laboratório.

Um maior infiltrado celular no pâncreas dos animais do grupo POA quando comparado com o grupo controle, reflete em uma pior análise histopatológica no tecido, com o aumento do edema, necrose de células acinares e um maior infiltrado inflamatório. A piora do escore histopatológico também é esperado, já

que os neutrófilos e macrófagos desempenham um papel crucial no desenvolvimento e manifestação da pancreatite aguda. Um recrutamento exacerbado de neutrófilos para o pâncreas leva à lesão tecidual por meio da produção de metabólitos reativos do oxigênio, mieloperoxidase, e citocinas que amplificam a resposta inflamatória (Genovese et al., 2006). Os macrófagos secretam diversos mediadores inflamatórios, que resultam na ativação e recrutamento de leucócitos da circulação, amplificando a inflamação local com consequências sistêmicas (Akbarshahi et al., 2012; Bhatia et al., 2000; Denham et al., 1997; Gea-Sorli et al., 2011).

Ao induzir nosso modelo experimental de pancreatite aguda nos animais CCR2^{-/-}, observamos uma proteção na letalidade desses animais comparados com os animais selvagens (WT). Quando avaliamos os níveis dos marcadores bioquímicos da pancreatite aguda, observamos que não houve aumento de amilase e lipase séricas nos animais CCR2^{-/-} POA, nem de infiltrado de macrófagos no tecido pancreático. A avaliação histopatológica nos mostra menor infiltrado celular e necrose de celulares acinares nesses animais. A sinalização de CCL2 via seu receptor CCR2 possui um papel dominante no recrutamento de macrófagos para o peritônio. Kuziel e colaboradores (1997) mostraram que camundongos deficientes para o receptor CCR2 possuem uma diminuição acentuada do recrutamento de macrófagos peritoneais após a indução do processo inflamatório pela administração de tioglicolato. A ausência de recrutamento de macrófagos para o pâncreas, nos animais deficientes para o receptor CCR2 é, então, esperada, já que o receptor da quimiocina CCL2, principal molécula que controla o recrutamento de macrófagos para o peritônio, se encontra ausente nesses animais. Apenas o infiltrado de neutrófilos não foi reduzido nos animais CCR2^{-/-} POA. Semelhante ao nosso resultado, Malecki e colaboradores (2014) mostraram que apenas o recrutamento de macrófagos para o pâncreas é evitado, ao tratar os animais com um antagonista de CCR2, em um modelo de pancreatite aguda induzido por taurocolato sódico. Neste trabalho, o recrutamento de neutrófilos para o órgão também não é evitado. Em conjunto, esses dados sugerem que houve um menor comprometimento do pâncreas nos animais CCR2^{-/-} quando comparados com os animais WT POA, que refletiu na proteção da letalidade nesses animais após a indução do modelo

experimental. No entanto, apesar da redução de necrose acinar, a presença do infiltrado de neutrófilos no pâncreas indica que a proteção do tecido pancreático não foi por completo.

Uma das principais características da pancreatite aguda grave é a transição de uma inflamação local no pâncreas para uma resposta inflamatória sistêmica, chegando até o pulmão (Bhatia et al., 2000). Ao avaliar os níveis séricos das quimiocinas CXCL1 e CCL2, observamos níveis elevados de CCL2 tanto nos animais WT POA quanto nos animais CCR2^{-/-} POA, quando comparados com seus controles. Porém, de modo interessante, o aumento da quimiocina CXCL1 foi maior nos animais WT POA em comparação com os animais CCR2^{-/-} POA. A quimiocina CXCL1 é um potente quimiotático de neutrófilos nos camundongos. É um homólogo funcional da quimiocina CXCL8 dos humanos, e está envolvido em diversos distúrbios inflamatórios (Sekido et al., 1993). Elevadas concentrações de CXCL8 circulantes correlacionam-se com a alta mortalidade de pacientes em condições inflamatórias sistêmicas, como a pancreatite aguda (Hack et al., 1992). Em nosso trabalho, também podemos correlacionar a maior letalidade dos animais WT POA com o maior nível de CXCL1 nesses animais, quando comparamos com os animais CCR2^{-/-} POA, que possuem menor letalidade e menor nível de CXCL1. Complementarmente, a quimiocina CCL2 é um marcador sérico de inflamação pulmonar e seu nível aumentado pode ser correlacionado com a gravidade da doença, podendo ser um indicativo que o nosso modelo experimental foi capaz de desenvolver a forma grave da doença, com possível lesão pulmonar remota.

O próximo passo do nosso trabalho foi avaliar os aspectos inflamatórios no pulmão. Ao observarmos um maior recrutamento de leucócitos para as vias aéreas dos animais do grupo POA, confirmamos que nosso modelo de pancreatite aguda realmente foi capaz de causar uma lesão pulmonar. Realizamos a contagem diferencial desses leucócitos e percebemos uma diferença nas populações leucocitárias dos animais WT POA e CCR2^{-/-} POA. O aumento dos leucócitos totais recuperados no BAL foi causado, principalmente, pelo maior influxo de neutrófilos e macrófagos para as vias aéreas nos animais WT POA quando comparados com os animais CCR2^{-/-} POA. Em contrapartida, nos animais CCR2^{-/-} POA ocorreu um maior recrutamento de linfócitos para as

vias aéreas, ao contrário dos animais WT POA. Esses resultados indicam que o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas, principalmente neutrófilos e macrófagos, importantes na geração de lesão pulmonar, é diminuído nos animais CCR2^{-/-}-POA quando comparados com animais WT POA, sugerindo uma proteção na lesão pulmonar dos camundongos deficientes para o receptor CCR2.

Utilizamos o lavado bronco alveolar para dosagem de proteínas totais e o aumento de exsudação de proteínas nos animais WT POA corrobora com a ideia de que a indução do nosso modelo experimental foi capaz de alcançar órgãos mais remotos, como o pulmão, e que a gravidade da pancreatite experimental nos animais WT é maior que nos animais CCR2^{-/-}, visto que não observamos um aumento de exsudação proteica nestes animais. O aumento da exsudação de proteínas nas vias aéreas reflete o edema e o extravasamento protéico que se seguem ao evento inflamatório (Lin et al., 2008).

Ao avaliarmos o nível das quimiocinas CXCL1 e CCL2 no pulmão, pudemos observar que ambas quimiocinas se encontram elevadas nos camundongos WT POA e, assim como no soro, a ausência do receptor CCR2 impede o aumento exacerbado de CXCL1 nos camundongos CCR2^{-/-} POA. Esse aumento da quimiocina CXCL1 refletiu no aumento do recrutamento de neutrófilos no pulmão, tanto nos animais WT POA quanto nos animais CCR2^{-/-}. Por outro lado, encontramos um acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar apenas nos animais CCR2^{-/-}, indicando algum mecanismo de recrutamento de macrófagos diferente do mecanismo usual via ligação de CCL2 com seu receptor CCR2.

Os macrófagos alveolares estão envolvidos no desenvolvimento de distúrbios agudos locais como pancreatite aguda. Eles secretam diversas citocinas e quimiocinas que contribuem no desenvolvimento da lesão pulmonar. Possuem funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no trato respiratório, dependendo da fase da resposta inflamatória, fase inicial ou resolvente (Akbarshahi et al., 2012; Gea-Sorli et al., 2011). Por algum mecanismo diferente do que ocorre na migração de macrófagos via CCL2/CCR2, os animais CCR2^{-/-} apresentaram acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar. Cardona e

colaboradores (2016) demonstraram o papel *scavenger* de receptores de quimiocinas no *clearance* e homeostase. Animais deficientes para receptores de quimiocinas possuem altos níveis de seus ligantes (Cardona et al., 2016), corroborando com nossos resultados de dosagens de CCL2 nos animais CCR2^{-/-} e em outros modelos de inflamação pulmonar (Wareing et al., 2007; Dawson et al., 2000). Apesar da principal quimiocina que controla o recrutamento de macrófagos ser a CCL2, estudos demonstraram a importância de outras quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CXCL10 e CXCL11 no recrutamento de monócitos/macrófagos em respostas inflamatórias. Os animais CCR2^{-/-} POA apresentam um acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar e, apesar de não possuímos dados que expliquem esse acúmulo, os animais CCR2^{-/-} podem estar expressando, em maior quantidade, receptores dessas outras quimiocinas importantes no recrutamento de macrófagos, como os receptores CCR1, CCR3, CCR5 e CXCR3 (Baggiolini et al., 1997; Deshmane et al., 2009; Opacek et al., 2007; Sherry et al., 1988; Torraca et al., 2015; Tomita et al., 2016; Zhou et al., 2010), por um mecanismo compensatório, que poderia viabilizar a migração de macrófagos via esses receptores para o foco da lesão pulmonar.

Outra explicação que poderia ser dada para esse acúmulo de macrófagos no pulmão dos animais CCR2^{-/-}, é que o recrutamento celular não é o único mecanismo que aumenta o número de macrófagos no tecido. Estudos têm demonstrado a importância da proliferação celular de macrófagos no tecido em condições inflamatórias, como injúria cardíaca, peritonites, aterosclerose, entre outras (Davies et al., 2013; Epelman et al., 2014; Jenkins et al., 2001; Randolph, 2014; Robbins et al., 2013). Então, esses macrófagos alveolares podem estar proliferando no tecido, e a ausência do receptor CCR2, pode causar uma dificuldade de migração desses macrófagos para as vias aéreas via CCL2, sendo observado menor número de macrófagos no BAL dos animais CCR2^{-/-} quando comparados com animais WT POA.

Os linfócitos, além de CCR2, também expressam receptores como CCR1, CCR5 e CXCR3, que são comuns com receptores nos macrófagos. Em infecções bacterianas no pulmão, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, doenças sistêmicas inflamatórias e alergias, linfócitos T podem se encontrar co-

localizados com macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, dependendo do tipo de resposta Th1 ou Th2, sendo recrutados pelo mesmo conjunto de quimiocinas (D'Ambrosio et al., 2001).

Linfócitos residem no pulmão em números relativamente pequenos. Eles possuem um papel importante na resposta imune durante uma infecção e/ou inflamação. Durante uma resposta inflamatória pulmonar, os linfócitos podem migrar para o órgão e possuem a função, não só na manutenção resposta imune, mas também na regulação dessa resposta (Perl et al., 2011). No entanto, há poucos trabalhos sobre o papel dos linfócitos na fisiopatologia da SDRA. Em um modelo murinho de lesão pulmonar induzida por endotoxina, Morris e colaboradores (1997) mostraram que além de neutrófilos, linfócitos são recrutados para o pulmão (Morris et al., 1997). Similar a esse modelo, Nakajima e colaboradores (2010) mostraram que após a administração de endotoxina no pulmão, o número de linfócitos no lavado bronco alveolar dos animais aumentou (Nakajima et al., 2010). No nosso modelo experimental de pancreatite aguda, observamos um aumento de linfócitos no lavado bronco alveolar apenas de animais CCR2^{-/-}, mas não avaliamos a presença de linfócitos no tecido pulmonar. Venet e colaboradores (2009) observaram em um modelo experimental de SDRA extrapulmonar, que linfócitos T CD4⁺, uma subpopulação de linfócitos com atividades regulatórias, são recrutados para o pulmão e são capazes de diminuir o recrutamento de neutrófilos pelo aumento da produção de IL-10. Outros trabalhos confirmam essa função regulatória de linfócitos T CD4⁺ em modelos de SDRA. D'Alessio e colaboradores (2009), e Aggarwal e colaboradores (2009) observaram o papel regulador de linfócitos na fase de recuperação de lesão pulmonar induzida por LPS (Aggarwal et al., 2009; D'Alessio et al., 2009; Venet et al., 2009). A presença de linfócitos pode, então, ser importante na regulação da lesão pulmonar associada à pancreatite aguda, produzindo citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que pode estar atenuando a lesão pulmonar nos animais CCR2^{-/-}, que apresentaram um maior infiltrado de linfócitos.

Assim como ocorre no pâncreas, neutrófilos ativos recrutados para o pulmão secretam substâncias como elastase, mieloperoxidase, substâncias proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas, causando

lesão endotelial e epitelial, além de amplificar toda a resposta inflamatória no pulmão (Akbarshahi et al., 2012; Goodman et al., 1998). Neutrófilos estão presentes tanto no pulmão de pacientes com SDRA, quanto no pulmão de animais em modelos experimentais induzidos por ceruleína (Bhatia et al., 1998; Feddersen et al., 1991; Guice et al., 1989, Inoue et al., 1995), podendo ser, também, um dos principais causadores da lesão pulmonar em nosso modelo.

Por fim, realizamos a análise da mecânica pulmonar e observamos que a lesão pulmonar causada pela indução de nosso modelo experimental piorou todos os aspectos da mecânica pulmonar avaliados nos animais WT POA, como redução da capacidade pulmonar total, capacidade residual funcional, capacidade inspiratória, volume residual, complacência quasi-estática, aumento de resistência pulmonar e perda de volume alveolar observado na curva pressão-volume. Em contrapartida, não observamos nenhuma piora dos aspectos da mecânica pulmonar observados, nos animais deficientes para o receptor CCR2, sugerindo que a deficiência do receptor CCR2 protege os animais de uma lesão pulmonar associada à pancreatite aguda.

Algumas alterações na mecânica pulmonar de pacientes com SDRA são esperadas, como redução da complacência, decorrente do edema intersticial e alveolar, além de colapso alveolar, que exige grandes pressões para abertura durante a inspiração, e consequente aumento da resistência das vias aéreas, decorrente do acúmulo de líquido e espessamento das paredes das vias distais (Pinheiro e Oliveira, 2004).

Apenas alguns poucos modelos experimentais de pancreatite aguda têm sido utilizados para estudar alterações na função pulmonar. A mecânica pulmonar é realizada durante a ventilação mecânica, que possibilita a medida de várias alterações relacionadas às doenças pulmonares, em diversos parâmetros. Dois estudos, utilizando modelos invasivos induzidos pela infusão de taurocolato de sódio, observaram aumento da resistência pulmonar (Lichtenstein et al., 2000; Milani et al., 1995) e, um outro modelo invasivo, realizado pela ligadura do canal pancreático, encontrou aumento da complacência pulmonar (Berry et al., 1982). Outros dois estudos utilizando um modelo experimental induzido por ceruleína, e um modelo experimental induzido por ceruleína com adição de LPS,

observaram leves alterações na mecânica pulmonar dos animais, como aumento de resistência e elastância pulmonar (Elder et al., 2011; 2012). No entanto, a relevância clínica desses modelos em relação a lesão pulmonar associada à pancreatite é questionável devido ao fato de não se relacionar com a etiologia da doença.

De acordo com nossos resultados, observamos que o modelo experimental induzido por ácido palmitoleico e etanol é um interessante modelo para se estudar a pancreatite aguda e lesão pulmonar associada à doença, com a possibilidade de se alterar a dose com a finalidade de alcançar a gravidade da doença desejada. É um modelo que possui uma etiologia bem semelhante à pancreatite aguda alcoólica que ocorre em humanos e gera uma inflamação sistêmica, que resulta em uma inflamação pulmonar. Existem muitos modelos que estudam lesão pulmonar causado por uma fonte pulmonar ou extrapulmonar, mas existem poucos estudos da lesão pulmonar associada à pancreatite exatamente pela dificuldade em reproduzir um modelo adequado de pancreatite aguda grave que causa lesão pulmonar.

Paralelo ao nosso estudo com animais selvagens, estudamos a pancreatite aguda experimental em animais deficientes para o receptor de quimiocina CCR2 e observamos a importância desse receptor no desenvolvimento da doença. A indução da pancreatite experimental em camundongos CCR2^{-/-} acontece de maneira mais leve, com pouco comprometimento pancreático e pulmonar. Observamos uma proteção da letalidade nos camundongos CCR2^{-/-}, provavelmente causada por uma menor inflamação pancreática e pulmonar. Poucos trabalhos estudaram o papel do receptor CCR2 na pancreatite aguda experimental e não há um consenso sobre seu papel de proteção ou exacerbação da inflamação. Nossos resultados revelam a importância do papel protetor do receptor CCR2 no desenvolvimento da pancreatite aguda experimental induzida por POA/etanol e nos indicam um possível alvo farmacológico para o tratamento da doença.

7 Conclusão

Nossos dados, em conjunto, sugerem que o modelo experimental induzido pela administração de ácido palmitoleico e etanol se mostrou um interessante modelo para estudo da pancreatite aguda com lesão pulmonar remota, e que o receptor de quimiocinas CCR2 possui papel fundamental no desenvolvimento da doença, participando da regulação do processo inflamatório local e sistêmico.

-

8 Referências Bibliográficas

Adamson I.; Bowden D. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest*; 30: 35–42. 1974.

Akbarshahi H.; Rosendahl A.H.; Westergren-Thorsson G.; Andersson R. Acute lung injury in acute pancreatitis e Awaiting the big leap. *Respiratory Medicine*; 106, 1199e1210. 2012.

Al-Haddad M.; Khashab M.; Zyromski N.; Pungpapong S.; Wallace M. B; Scolapio J.; Raimondo, M. Risk factors for hyperechogenic pancreas on endoscopic ultrasound: a case-control study. *Pancreas*, 38(6), 672-675. 2009.

Altomare E.; Grattagliano I.; Vendemiale G.; Palmieri V.; Palasciano G. Acute ethanol administration induces oxidative changes in rat pancreatic tissue. *Gut*; 38:742e6. 1996.

Apte M.V.; Pirola R.C.; Wilson J.S. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25: 1816–1826. 2010.

Armstrong L.; Milla A.B. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax*; 52: 442–446. 1997.

Ashbaugh D.G.; Bigelow D.B.; Petty T.L.; Levine B.E. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*; 2:319-23. 1967.

Banks P.A. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest Endoscopy* 56: 226–230. 2002.

Banks P.A.; Freeman M.L.; and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice Guidelines in Acute Pancreatitis. *Am J Gastroenterol*; 101:2379–2400. 2006.

Barbas C.S.V.; Isola A.M.; Farias A.M.C.; et al. Brazilian recommendations of mechanical ventilation 2013. Part I. *Rev Bras Ter Intensiva*; 26: 89–121. 2014.

Bernard C. *Lecons de physiologie experimentale*. Paris. Bailliere; 2: 278. 1856.

Bernard G.R., Artigas A., Brigham K.L., Carlet J., Falke K., Hudson L.; Lamy M.; Legall J.R.; Morris A.; Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.*; 149(3Pt1):818-24. 1994.

Berry A.R.; Taylor T.V. Effect of drugs on the pulmonar changes in experimental acute pancreatitis in the rat. *Gut*; 23:481–484. 1982.

Bhatia M.; Brady M.; Shokuhi S.; Christmas S.; Neoptolemos J.P.; Slavin J. *Journal of Pathology*; 190: 117±125. 2000.

Bhatia M.; Brady M.; Zagorski J.; Christmas S.E.; Campbell F.; Neoptolemos J.P.; Slavin J. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut*; 47:838–844. 2000.

Bhatia M.; Hofbauer B.; Lee H.S.; Frossard J.L.; Steer M.L. The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasivemodel of acute pancreatitis-associated lung injury. *IntJ Pancreatol*; 24: 77-83. 1998.

Bhatia M.; Ramnath R.D.; Chevali L.; Guglieumotti A. Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice againts acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 288: G1259e65. 2005.

Bhatia M.; Saluja A.K.; Hofbauer B.; Frossard J.L.; Lee H.S.; Castagliuolo I.; Wang C.C.; Gerard N.; Pothoulakis C.; Steer M.L. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95(8): 4760e5. 1998.

Bhatia M.; Saluja A.K.; Singh V.P.; Frossarj J.L.; Lee H.S.; Bhagat L.; Gerard C.; Steer M.L. Complement factor C5a exerts an anti-inflammatory effect in acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 280: G974–G978. 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações em Saúde - 2011 [acesso em 2017 janeiro 17]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/niuf.def>

Browne G.W.; Pitchumoni C.S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*; 12(44): 7087-7096. 2006.

Burns A.R.; Smith C.W.; Walker D.C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev*; 83:309-336. 2003.

Campos T.; Deree J.; Coimbra R. From Acute Pancreatitis to End-Organ Injury: Mechanisms of Acute Lung Injury. *Surgical Infections*, volume 8, Number 1. 2007.

Campos T.; Parreira J.G.; Utiyama E.; Rasslan S. Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet]; 35(5). 2008.

Carroll J.K.; Herrick B.; Gipson T.; Lee S.P. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. *Am Fam Physician*., v. 15, n.75(10), p.1513-20. 2007.

Chooklin S. Pathogenic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*.; vol 8, p 186. 2009.

Chowdhury P.; Gupta P. Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: An overview. *World J Gastroenterol*; 12(46): 7421-7427. 2006.

Clancy T.E.; Benoit E.P.; Ashley S.W. Current management of acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg*; 9(3):440-52. 2005.

Clemens D.L.; Schneider K.J.; Arkfeld C.K.; Grode J.R.; Wells M.A.; Singh S. Alcoholic pancreatitis: New insights into the pathogenesis and treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol*; 7(1): 48-58. 2016.

Colletti L.M.; Kunkel S.L.; Walz A.; Burdick M.D.; Kunkel R.G.; Wilke C.A.; Strieter R.M. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion– induced lung injury in the rat: the role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest*; 95:134–141. 1995.

Corfield A. P.; Cooper M. J.; Williamson R. C. Acute pancreatitis: A lethal disease of increasing incidence. *Gut* 26: 724. 1985.

Criddle D.N. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison, *Pancreatology*. 2015.

Criddle D.N.; Murphy J.; Fistetto G.; Barrow S.; Tepikin A.V.; Neoptolemos J.P.; Sutton R.; Petersen O.H. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology*; 130: 781–93. 2006.

Criddle D.N.; Raraty M.G.; Neoptolemos J.P.; Tepikin A.V.; Petersen O.H.; Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:10738e43. 2004.

Cuzzocrea S.; Mazzon E.; Dugo L.; Centorrino T.; Ciccolo A.; McDonald M.C.; Sarro A.; Caputi A.P.; Thiernemann C. Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice. *Cytokine*; 18:274–285. 2002.

D'Ambrosio D.; Mariani M.; Panina-Bordignon P.; Sinigaglia F. Chemokines and Their Receptors Guiding T Lymphocyte Recruitment in Lung Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*; Vol 164. pp 1266–1275. 2001.

Denham W.; Yang J.; Fink G.; Denham.; Carter G.; Ward K.; Norman J. Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology*; 113: 1741-1746. 1997.

Dimitrijevic O.B.; Stamatovic S.M.; Keep R.F; Andjelkovic A.V. Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*; 26:797e810. 2006.

Dufour M.C., Adamson M.D. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*; 27:286e90. 2003.

Elder A.S.; Saccone G.T.; Berstein A.D.; Dixon D.L. Caerulein-induced acute pancreatitis results in mild lung inflammation and altered respiratory mechanics. *Experimental Lung Research*; vol 37, p 69. 2011.

Elder A.S.; Saccone G.T.; Berstein A.D.; Dixon D.L. Evaluation of lung injury and respiratory mechanics in a rat model of acute pancreatitis complicated with endotoxin. *Pancreatol*; Vol 12, p 240. 2012.

Feddersen C.O.; Willemer S.; Karges W.; Puchner A.; Adler G.; Wichert P.V. Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. II. Functional studies. *Int J Pancreatol*; 8(4): 323e31. 1991.

Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol*; 211(4):383e8. 2007.

Formela L.J.; Wood L.M.; Whittaker M.; Kingsnorth A.N. Amelioration of experimental acute pancreatitis with a potente platelet-activating factor antagonist. *Br J Surg*; 81: 1783-1785. 1994.

Friedreich N. *Disease of the Pancreas*. New York: William Wood. 1878.

Frossard J.L.; Lenglet S.; Montecucco F.; Steffens S.; Galan K.; Pelli G.; Spahr L.; Mach F.; Hagengue A. Role of CCL-2, CCR-2 and CCR-4 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *J Clin Pathol*; 64:387e393. 2011.

Frossard J.L.; Saluja A.; Bhagat L.; Lee H.S.; Bhatia M.; Hofbauer B.; Steer M.L. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology*; 116: 694-701. 1999.

Frossard J.L.; Steer M.L.; Pastor C.M. *Lancet*; 371: 143–52. 2008.

Gattinoni L.; Pelosi P.; Suter P.M.; Pedoto A.; Vercesi P.; Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease: different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med*; 158: 3–11. 1998.

Gea-Sorli S.; Guillamat R.; Serrano-Mollar A.; Closa D. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. *J Pathol*; 223(3):417e24. 2011.

Genovese T.; Mazzon E.; Di Paola R.; Muià C.; Crisafulli C.; Malleo G.; Esposito E.; Cuzzocrea S. Role of peroxisome proliferator activated receptor-alpha in acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology*; v. 118, p. 559-570. 2006.

Gerard C.; Gerard N.P. C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Ver Immunol*; 12:775–808. 1994.

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*; 2:108e15. 2001.

Gerasimenko J.V.; Gerasimenko O.V.; Petersen O.H. The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis. *J Physiol*; 592: 269-280. 2014.

Gerasimenko J.V.; Lur G.; Sherwood M.W.; Ebisui E.; Tepikin A.V.; Mikoshiba K.; Gerasimenko O.V.; Petersen O.H. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca²⁺ release via acid store IP₃ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106: 10758-10763. 2009.

Gilliland L.; Steer M.L. Effects of ethionine on digestive enzyme synthesis and discharge by mouse pancreas. *Am J Physiol*; 239: G418-26. 1980.

Gross V.; Leser H. G.; Heinisch A.; Scholmerich J. Inflammatory mediators and cytokines-New aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis? *Hepatogastroenterology* 40: 522. 1993.

Guice K.S.; Oldham K.T.; Caty M.G.; Johnson K.J.; Ward P.A. Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg*; 210(6): 740e7. 1989.

Guimarães M.A.C.F.; Maya A.C.A.; Leal P.R.F.; Melgaço A.S. Pancreatite aguda: etiologia, apresentação, clínica e tratamento. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UFRJ*. 2009.

Gukovsky I.; Gukovskaya A.; Blinman T.A.; Zaninovic V.; Pandol S.J. Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol*; 275 (Gastrointest. Liver Physiol. 38): G1402–G1414. 1998.

Gukovsky I.; Pandol S.J.; Mareninova O.A.; Shalbueva N.; Jia W.; Gukovskaya A.S. Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.*, v.27 Suppl., n.2, p.27–32. 2012.

Guy O.; Robles-Diaz G.; Adrich Z.; Sahel J.; Sarles H. Protein content of precipitates present in pancreatic juice of alcoholic subjects and patients with chronic calcifying pancreatitis. *Gastroenterology*; 84:102e7. 1983.

Haber P.S.; Wilson J.S.; Apte M.V.; Pirola R.C. Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. *J. Lab. Clin. Med.*; 121: 759–64. 1993.

Hack C.E.; Hart M.; van Schijndel R.J.; Eerenberg A.J.; Nuijens J.H.; Thijs L.G.; Aarden L.A. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun*; 60: 2835-2842. 1992.

Herreros-Villanueva M.; Hijona E.; Bañales J.M.; Cosme A.; Bujanda L. Alcohol consumption on pancreatic diseases. *World J Gastroenterol*; 19(5): 638-647. 2013.

Hofbauer B.; Bhatia M.; Frossard J.L.; Lee H.S.; Bhagat L.; Steer M.L. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*; 115: 1238-1247. 1998.

Hogg J.C.; Doerschuk C.M. Leukocyte traffic in the lung. *Annu Rev Physiol* 57: 97–114. 1995.

Hopken U.E.; Gerard N.P.; Gerard C. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature*; 383: 86-89. 1996.

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.; Greenhalf W.; Mukherjee R.; Kaphalia B.S.; Jaffar M.; Petersen O.H.; Tepikin A.V.; Sutton R.; Criddle D.N. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca²⁺-

dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis *Gut*; 63:1313–1324. 2014.

Hue Su K.; Cuthbertson C.; Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*; 8(4):264-286. 2006.

Hughes C.B.; Henry J.; Kotb M.; Lobaschevsky A.; Sabek O.; Gaber A.O. Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *J Surg Res*; 59: 687-693. 1995.

Inoue S.; Nakao A.; Kishimoto W.; Murakami H.; Itoh K.; Itoh T.; Harada A.; Nonami T.; Tagaki H. Anti neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg*;130(1):93e8. 1995.

Janigan D.T.; Nevalainen T.J.; MacAulay M.A.; Vethamany V.G. Foreign serum-induced pancreatitis in mice. I. A new model of acute pancreatitis. *Lab Invest*; 33: 591-607. 1975.

Jeannin P.; Delneste Y.; Gosset P.; Molet S.; Lassalle P.; Hamid Q.; Tsicopoulos A.; Tonnel A.B. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood*; 84: 2229-2233. 1994.

Jenkins S.J.; Rucker, D.; Cook P.C.; Jones L.H.; Finkelman F.D.; van Rooijen N.; MacDonald A.S.; Allen J. E. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6035), 1284–1288. 2011.

Kamath M.G.; Pai C.G.; Kamath A.; Kurien A. Monocyte chemoattractant protein-1, transforming growth factor-beta1, nerve growth factor, resistin and hyaluronic acid as serum markers: comparison between recurrent acute and chronic pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*; 15(2): 209-215. 2016.

Katz M.; Carangelo R.; Miller L.J.; Gorelick F. Effect of ethanol on cholecystokininstimulated zymogen conversion in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 270: G171e5. 1996.

Kono H.; Nakagami M.; Rusyn I.; Connor H.D.; Stefanovic B.; Brenner D.A.; Mason R.P.; Arteel G.E.; Thurman R.G. Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat. *AJP e Gastrointest Liver Physiology*; 280: G1178e86. 2001.

Konturek S.J.; Dembinski A.; Konturek P.J.; Warzecha Z.; Jaworek J.; Gustaw P.; Tomaszewska R.; Stachura J. Role of platelet activating factor in pathogenesis of acute pancreatitis in rats. *Gut*; 33: 1268-74. 1992.

Kuhn C. Ultrastructure and cellular function in the distal lung. *Monogr Pathol*; 19: 1–20. 1978.

Kumar V.; Abbas A.; Fausto N.; Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th Edition. Philadelphia, Pa: Elsevier Inc. 2010.

Kusske A.M.; Rongione A.J.; Ashley S.W.; McFadden D.W.; Reber H.A. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery*; 120: 284-288. 1996.

Kyriakides C.; Jasleen J.; Wang Y.; Moore F.D.; Ashley S.W.; Hechtman H.B. Neutrophils, not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis. *Pancreas*; 22: 40-46. 2001.

Lampel M.; Kern H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*; 373: 97-117. 1977.

Laposata E.A.; Lange L.G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science*; 231:497e9. 1986.

Lerch M.M.; Saluja A.K.; Dawra R.; Saluja M.; Steer M.L. The effect of chloroquine administration on two experimental models of acute pancreatitis. *Gastroenterology*; 104:1768–1779. 1993.

Lichtenstein A.; Milani R.; Fernezlian S.M.; Leme A.S.; Capelozzi V.L.; Martins M.A. Acute lung injury in two experimental models of acute pancreatitis: infusion of saline or sodium taurocholate into the pancreatic duct. *Crit Care Med*; 28:1497–1502. 2000.

Lin, K. L., Y. Suzuki, et al. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J Immunol*; 180(4): 2562-72. 2008.

Lo C.J.; Fu M.; Cryer H.G. Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome. *J Surg Res*; 79:179–184. 1998.

Lombardi B.; Estes L.W.; Longnecker D.S. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol*; 79: 465-80. 1975

Longo D.; Fauci A.; Kasper D.; Hauser S.; Jameson J.; Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine 18th Edition*; 18: 2635-38. 2011.

Luster A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*; 338:436-445. 1998.

Luthen R.E.; Niederau C.; Grendell J.H. Glutathione and ATP levels, subcellular distribution of enzymes, and permeability of duct system in rabbit pancreas following intravenous administration of alcohol and cerulein. *Dig Dis Sci*; 39: 871-9. 1994.

Malecki E.A.; Castellanos K.J.; Cabay R.J.; Fantuzzi G. Therapeutic administration of orlistat, rosiglitazone or the chemokine receptor antagonist

RS102895 fails to improve the severity of acute pancreatitis in obese mice. *Pancreas*. August ; 43(6): 903–908. 2014.

Mantovani A. The chemokine system: Redundancy for robust outputs. *Immunol Today*.; 20:254-257. 1999.

Milani R.; Pereira P.M.; Dolhnikoff M.; Saldiva P.H.; Martins M.A. Respiratory mechanics and lung morphometry in severe pancreatitis-associated acute lung injury in rats. *Crit Care Med*; 23:1882–1889. 1995.

Mizunuma T.; Kawamura S.; Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr*; 114: 467-71. 1984.

Murphy P.M.; Baggiolini M.; Charo I.F.; Hebert C.A.; Horuk R.; Matsushima K.; Miller L.H.; Oppenheim J.J.; Power C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol ver*; 52(1):145-176. 2000.

Niederau C.; Ferrell L.D.; Grendell J.H. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*; 88(5 Pt 1):1192_204. 1985.

Nordback I.H.; MacGowan S.; Potter J.J.; Cameron J.L. The role of acetaldehyde in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. *Ann. Surg.*; 214: 671–8. 1991.

Norman J.G.; Fink G.W.; Franz M.G. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*;130(9):966e70. 1995.

Norman J.G.; Fink G.W.; Messina J.; Carter G.; Franz, M.G. Timing of tumor necrosis factor antagonist is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery*, v. 120, p. 515-521. 1996.

Opie E.L. The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. *Johns Hopkins Hosp Bull*; 12: 19–21. 1901.

Pandol S.J.; Lugea A.; Mareninova O.A.; Smoot D.; Gorelick F.S.; Gukovskaya A.S.; Gukovsky I. Investigating the pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Alcohol Clin Exp Res*; 35:830e7. 2011.

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 cholecystinin octapeptide. *Gastroenterology*; 117:706–16. 1999.

Pandol S.J.; Saluja A.K.; Imrie C.W.; Banks P.A. Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside. *Gastroenterology*; 132:1127–1151. 2007.

Pastor C.M.; Matthay M.A.; Frossard J.L. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest*; 124: 2341-2351. 2003.

Pelosi P.; D'Onofrio D.; Chiumello D.; Paolo S.; Chiara G.; Capelozzi V.L.; Barbas C.S.V.; Chiarando M.; Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are diferente, *Eur Respir J*; 22: Suppl. 42, 48s–56s. 2003.

Perl M.; Lomas-Neira J.; Venet F.; Shiang Chung C.; Ayala A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med*. February; 5(1): 115–126. 2011.

Pinheiro B.V.; Oliveira J.C. Ventilação Mecânica. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. *Pneumoatual*. 2004.

Quon M.G.; Kugelmas M.; Wisner J.R.; Chandrasoma P.; Valenzuela J.E. Chronic alcohol consumption intensifies caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol*;12: 31-9. 1992.

Ranieri V.M.; Rubinfeld G.D.; Thompson B.T.; Ferguson N.D.; Caldwell E.; Fan E.; Camporota L.; Slutsky A.S. Acute Respiratory Distress Syndrome The Berlin Definition. *JAMA*; 307(23). 2012.

Renner I. G.; Savage W. T.; Pantoja J. L.; Renner V. J. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig. Dis. Sci.* 30: 1005. 1985.

Renner I.G.; Wisner J.R. Exogenous secretin ameliorates ceruletide induced acute pancreatitis in the dog. *Dig Dis Sci*; 28:946. 1983.

Rongione A.J.; Kusske A.M.; Kwan K.; Ashley S.W.; Reber H.A.; McFadden D.W. Interleukin-10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology*; 112: 960-967. 1997.

Rot A.; von Andrian U.H. Chemokines in innate and adaptative host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*; 22:891e928. 2004.

Russo R.C.; Garcia C.C; Teixeira M.M.; Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Ver Clin Immunol*;10(5):593-619. 2014.

Sailai Y.; Yu X.; Baiheti P.; Tang H.; Li Y.; Xu M. Influence of nuclear factor kappaB activation on inflammatory mediators of alveolar macrophages in rats with acute necrotizing pancreatitis. *J Investig Med*; 58(1):38e42. 2010.

Sanfey H.; Bulkley G.B.; Cameron J.L. The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three diferente experimental models. *Ann Surg*; 201:633e9. 1985.

Schmidt J.; Levandrowsi K.; Warshaw A.L.; Compton C.C.; Rattner D.W. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol*; 12: 41-51. 1992.

Schneider A.; Whitcomb D.C.; Singer M.V. Animal models in alcoholic pancreatitis— what can we learn? *Pancreatology*; 2:189–203. 2002.

Seitz M.; Dewald B.; Towbin H.; Gallati H.; Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol*; 25: 1129-1132. 1995.

Sekido N.; Mukaida N.; Harada A.; Nakanishi I.; Watanabe Y.; Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 365, 654–657. 1993.

Sekimoto M; Takada T.; Kawarada Y.; Hirata K.; Mayumi T.; Yoshida M.; Hirota M.; Kimura Y.; Takeda K.; Isaji S.; Koizumi M.; Otsuki M.; Matsuno S. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.*, v. 13, p.10–24. 2006.

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*;144. 437e446 e436. 2013.

Soderberg B.L.; Salem R.O.; Best C.A.; Cluette-Brown J.E.; Laposata M. *Am J Clin Pathol*; 119(Suppl 1): S94-S99. 2003.

Souza D.G.; Bertini R.; Vieira A. T.; Cunha F. Q.; Poole S.; Allegretti M.; Colotta F.; Teixeira, M. M. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* 143, 132–142. 2004.

Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*; 346: 425-434. 1990.

Steer M.L. Early events in acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol*; 13: 213-216. 1999.

Sue R.D.; Belperio J.A.; Burdick M.D.; Murray L.A.; Xue Y.Y.; Dy M.C.; Kwon J.J.; Keane M.P.; Strieter R.M. CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *J Immunol*; 172:3860–3868. 2004.

Sun J.; Bhatia M. Blockade of neurokinin-1 receptor attenuates CC and CXC chemokine production in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 292(1): G143e53. 2007.

Swaroop V.S.; Chiari S.T.; Clain J.E. Severe Acute Pancreatitis. *JAMA*; 291:2865–2868. 2004.

Thal A. Studies on pancreatitis. II. Acute pancreatic necrosis produced experimentally by the arthus sensitization reaction. *Surgery*; 37: 911-7. 1955.

Thal A.; Brackney E. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis produced by local Schwartzman reaction: experimental study on pancreatitis. *JAMA*; 155: 569-74. 1954.

Thelen M.; Stein J.V. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol*; 9:953-959. 2008.

Torraca V.; Cui C.; Bebelman J.P.; Van der sar A.M.; Smith M.J.; Siderius M.; Spaink H.P.; Meijer A.H. The CXCR3-CXCL11 signaling axis mediates macrophage recruitment and dissemination of mycobacterial infection. *Disease Models & Mechanisms*. 2015.

Tsukahara Y.; Horita Y.; Anan K.; Morisaki T.; Tanaka M.; Torisu M. Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis. *J Surg Res*; 66(1): 43e50. 1996.

Tsushima K.; King L.S.; Aggarwal N.R.; De Gorordo A.; D'Alessio F.R.; Kubo K. Acute lung injury review. *Intern Med*; 48(9): 621e30. 2009.

Van der Poll T.; Smith S.R.; Swanson S.W.; Hack C.E.; Lowry S.F.; Moldawer L.L. Effects of IL-10 on systemic inflammatory response during lethal primate endotoxemia. *J Immunol*; 158: 1971-1975. 1997.

Vanoirbeek J.A.; Rinaldi M.; De Vooght V.; Haenen S.; Bobic S.; Gayan-Ramirez G.; Hoet P.H.; Verbeken E.; Decramer M.; Nemery B.; Janssens W. Noninvasive and Invasive Pulmonary Function in Mouse Models of Obstructive and Restrictive Respiratory Diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol Vol 42*. pp 96–104. 2010

Wang G.J.; Gao C.F.; Wei D.; Wang C.; Ding S.Q. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*;15(12):1427-30. 2009.

Ward J.B.; Petersen O.H.; Jenkins S.A.; Sutton R. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet* 346, 1016–1019. 1995.

Watanabe O.; Baccino F.M.; Steer M.L.; Meldolesi J. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol*; 246(4 Pt 1): G457_67. 1984.

Weibel E.R. *The Pathway for Oxygen: Structure and Function in the Mammalian Respiratory System*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press; p. 425. 1984.

Werner J.; Laposata M.; Fernandez-del Castillo C.; Saghir M.; Iozzo R.V.; Lewandowski K.B.; Warshaw A.L. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. *Gastroenterology*;113: 286e94. 1997.

Werner J.; Saghir M.; Warshaw A.L.; Lewandrowski K.B.; Laposata M.; Iozzo R.V.; Carter E.A.; Schatz R.J.; Fernandez-Del Castillo C. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *AJP e Gastrointest Liver Physiology*; 283: G65e73. 2002.

Yang R.; Uchiyama T.; Alber S.M.; Han X.; Watkins S.K.; Delude R.L.; Fink M.P. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med*; 32:1453–1459. 2004.

Zhou W.; Levine B.A.; Olson M.S. Platelet activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein stimulation. *Am J Pathol*; 142: 1504-1512. 1993.

Zhou G.X.; Zhu X.J.; Ding X.L.; Zhang H.; Chen J.P.; Qiang H.; Zhang H.F.; Wei Q. Protective effects of MCP-1 inhibitor on a rat model of severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*; 9:201- 207. 2010

Zlotnik A.; Yoshie O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*, Vol. 12, 121–127. 2000.