



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

DEYSEN KERLLA FERNANDES BEZERRA GIRÃO

**PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP 3 E DOS RECEPTORES
PURINÉRGICOS NA HIPERALGESIA VISCERAL DA PANCREATITE
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**

FORTALEZA-CEARÁ
2017

DEYSEN KERLLA FERNANDES BEZERRA GIRÃO

**PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP 3 E DOS RECEPTORES
PURINÉRGICOS NA HIPERALGESIA VISCERAL DA PANCREATITE
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

Co-orientador: Prof. Dr. David Neil Criddle.

FORTALEZA-CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G432p Girão, Deysen Kerlla Fernandes Bezerra.

Participação do inflamossoma NLRP 3 e dos receptores purinérgicos na hiperalgesia visceral da pancreatite alcoólica experimental / Deysen Kerlla Fernandes Bezerra Girão. – 2017.

110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

Coorientação: Prof. Dr. David Neil Criddle.

1. pancreatite aguda. 2. etanol. 3. inflamossoma. 4. nocicepção. I. Título.

CDD 615.1

DEYSEN KERLLA FERNANDES BEZERRA GIRÃO

**PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP 3 E DOS RECEPTORES
PURINÉRGICOS NA HIPERALGESIA VISCERAL DA PANCREATITE
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 12/06/17

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Orientador
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. José Milton de Castro Lima
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, Elcias e Neusa, a minha irmã, Raysa, e ao meu esposo, Robson, pessoas as quais devo eterna gratidão por ter tornado possível a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria por todas as bênçãos em toda a trajetória até aqui;

Aos meus pais, Elcias e Neusa, por toda a dedicação e cuidado;

A minha irmã, Raysa, pelo apoio constante;

Ao meu esposo, Robson, pelo companheirismo durante todos os anos de execução desta tese, compreendendo minhas ausências e cansaço;

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares pela orientação e confiança, sempre apoiando e motivando-me em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. David Neil Criddle, que em sua vasta experiência científica, aceitou realizar a co-orientação deste trabalho, honrando-me com suas valiosas contribuições;

À Prof. Dra. Mariana Lima Vale que participou desde a elaboração do projeto científico, do qual se originou esta tese, e em todos os momentos que necessitei;

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha pela disponibilidade e abertura em acolher-me em seu laboratório, possibilitando os experimentos com os animais modificados geneticamente;

Ao Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima, pelas aulas e conversas tão frutuosas em toda a vivência na pós-graduação;

A todos os membros da banca examinadora pelas valiosas correções e contribuições sem as quais certamente a qualidade do trabalho não seria a mesma;

À amiga-irmã e companheira científica Kaira Emanuella, que colaborou em todos os momentos desta tese, seja aprimorando o trabalho, seja enfrentando dias e noites de incansáveis experimentos, sobretudo os realizados fora do nosso laboratório de origem;

Ao amigo Álvaro Xavier, por toda a ajuda nos experimentos e ilustrações contidas nesta tese;

Ao amigo Tiago Santos, por toda a ajuda na formatação da tese;

Ao amigo Fábio Bezerra, que colaborou em vários experimentos, sendo apoio constante, sobretudo nos experimentos realizados em Ribeirão Preto;

À amiga Patrícia Pantoja, pela correção do inglês do *Abstract*;

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), que disponibilizaram sempre em me ajudar, em todas as fases: Cecília, Tiago Menezes, Lucas Nicolau, Marcos Aurélio, Samara,

Renan, Marielle, Priscila, Bárbara, Ronaldo, Johnatan, Carlos, e todos os alunos de iniciação científica, especialmente Pedro Almir, Athayde e João Victor;

Aos alunos e professores do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), no qual realizei os experimentos iniciais, em especial, Ana Maria, Mário e Kalina;

Aos alunos do Laboratório de Inflamação em Ribeirão Preto, especialmente, Mirian, Vanessa e Ricardo, pela acolhida;

Aos alunos e professores do Núcleo de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI), pela colaboração em muitos experimentos, especialmente, Josy, sempre tão prestativa;

À técnica Eliane, pelo suporte na organização e manutenção do laboratório;

Aos técnicos do Laboratório de Inflamação de Ribeirão Preto, Iêda Regina e Sérgio, pelos ensinamentos, disponibilidade de tempo e atenção nas duas vezes que estive nesse espaço;

Aos integrantes da secretaria de Pós-Graduação, em especial, Laura e Célia, pela solicitude na resolução de todas as demandas no período de vivência na pós-graduação;

A todas as colegas da UTI pediátrica do Hospital de Messejana, que entenderam a minha ausência nas atividades assistenciais e encorajaram-me a prosseguir, em especial, Mazé e Silvânia.

E a muitos, que embora não citados, deixaram a sua contribuição na vivência científica e pessoal durante o período de realização desse trabalho. Podem ter faltado muitos nomes a serem citados na escrita, mas todos eles estão marcados em minha trajetória.

A todos, muito obrigada!

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

Marthin Luther King

RESUMO

Um dos sintomas mais importantes da pancreatite é a dor abdominal, que, em geral, sinaliza a necessidade de atendimento nos serviços de saúde. Muitos aspectos da fisiopatologia desse fenômeno ainda não estão compreendidos. Sabe-se que a pancreatite inicia uma cascata de ativação de mediadores inflamatórios, que ocorre de forma estéril, por meio da ação de padrões moleculares de reconhecimento de moléculas associadas ao dano (DAMPs), dentre eles o ATP. A ativação do inflamossoma NLRP 3 é uma das vias possíveis de serem deflagradas por DAMPs, sendo o receptor P2X7 um dos componentes dessa via. Vários estudos mostram evidências da importância deste inflamossoma na pancreatite, mas ainda não foi investigado o papel destes na nocicepção, sobretudo com o álcool como agente etiológico. Nesse sentido, este trabalho buscou avaliar o papel do inflamossoma NLRP 3 na nocicepção visceral na pancreatite alcoólica, bem como o envolvimento dos receptores purinérgicos. Para isso, a pancreatite aguda foi induzida em camundongos *Swiss* (25-30g) por meio de duas injeções intraperitoneais de etanol (1,35 g/Kg), associado ou não ao ácido palmitoléico (POA) (150 mg/Kg), com intervalo de 1h. Os controles receberam etanol ou salina. Foi avaliada a curva de variação de peso e sobrevida, como marcadores do bem-estar do animal. Posteriormente, foi investigado o curso temporal da inflamação por meio da análise histopatológica, do nível sérico de amilase e lipase e da mensuração de mieloperoxidase (MPO) do pâncreas. Foi ainda avaliada a hiperalgesia visceral por meio do teste de Von Frey. No tempo de 24h, foram mensurados os níveis de citocinas pró-inflamatórias pancreáticas (IL-1 β , MCP-1, TNF- α e IL-6) e de marcadores de estresse oxidativo (MDA plasmático e GSH pancreático). O envolvimento de mastócitos e macrófagos na nocicepção foi avaliado mediante protocolos com a depleção destas células. A modulação da nocicepção por meio de receptores purinérgicos foi investigada através do uso de antagonistas, o PPADS (inespecífico para P2) e o BBG (seletivo para P2X7), administrados por via intravenosa, 30 min antes da avaliação da 24h após a indução da pancreatite. O efeito do BBG sob o SNC foi avaliado mediante a administração intratecal deste fármaco. A influência de componentes do inflamossoma NLRP 3 foi avaliada através do uso de camundongos geneticamente modificados para Caspase-1, NLRP 3, ASC, IL-1R e IL-18, sendo, para isso, utilizados animais C57BL (20-25g). Os resultados demonstraram que a associação etanol e POA causa diminuição do bem-estar do animal, com variação expressiva do peso e redução da sobrevida para 64,7%. A pancreatite alcoólica causou mudanças histopatológicas e aumento do nível sérico de enzimas pancreáticas, de MPO, de citocinas pró-inflamatórias e de estresse oxidativo. Essas mudanças cursam com hiperalgesia visceral (etanol + POA: 3,29 \pm 0,45 g, salina: 15,35 \pm 0,82 g,). Macrófagos e mastócitos são importantes para a ocorrência da hiperalgesia, com aumento dos limiares nociceptivos de 28% e 29%, respectivamente, mediante a depleção dessas células. O bloqueio inespecífico de receptores purinérgicos atenuou essa hiperalgesia (etanol + POA + PPADS 12,5 mg/Kg: 9,38 \pm 2,30 g, etanol + POA: 4,4 \pm 0,45 g), e este efeito ainda foi presente quando administrado um bloqueador específico de P2X7 (etanol + POA + BBG 50 mg/Kg: 8,14 \pm 0,50 g, etanol + POA: 3,35 \pm 0,49 g). Houve manutenção do efeito anti-nociceptivo com a administração do BBG por via intratecal (etanol + POA + BBG: 8,47 \pm 0,92 g, etanol + POA: 3,52 \pm 1,08 g). Foi demonstrada que a deleção de componentes do inflamossoma NLRP 3 (Caspase-1,

NLRP 3, ASC, IL-1R e IL-18) reduziu a hiperalgesia visceral, mostrando que essa via exerce papel importante nesse fenômeno. Concluímos que a hiperalgesia na pancreatite aguda envolve a participação dos receptores purinérgicos, ocorrendo, pelo menos parcialmente, por meio do envolvimento do inflamossoma NLRP 3. Além disso, comprovamos que macrófagos e mastócitos contribuem de maneira importante na nocicepção visceral.

Palavras-chave: pancreatite aguda, etanol, inflamossoma, nocicepção.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF NLRP 3 INFLAMMASOME AND PURINERGIC RECEPTORS IN VISCERAL HYPERALGESIA OF EXPERIMENTAL ALCOHOLIC PANCREATITIS

One of the most important symptoms of pancreatitis is the abdominal pain, which usually signals a need for care in health services. Much pathophysiology of this phenomenon is still not understood. It is known that a pancreatitis initiates a cascade of activation of inflammatory mediators, which occur in a sterile way, through the action of molecules recognition damage associated molecules pattern (DAMPs), among them the ATP. Activation of NLRP 3 inflammasome is one of the possible pathways to be triggered by DAMPs, with the P2X7 receptor being one of the components of this pathway. Several studies have showed the evidence of interest in this type of inflammasome in pancreatitis, but the nociceptive changes have not yet been investigated. This work sought to evaluate the role of the inflammasome NLRP 3 in the visceral nociception in alcoholic pancreatitis, as well as the involvement of the purinergic receptors. For this, acute pancreatitis was induced in Swiss mice (25-30g) by two intraperitoneal injections of ethanol (1.35g/kg), associated or not to palmitoleic acid (POA) (150 mg/kg), with an interval of 1h. Controls received either ethanol or saline. A curve of variation of weight and survival was evaluated as markers of animal welfare. Subsequently, the temporal course of inflammation was investigated by the histopathological analysis, the serum amylase lipase level and the myeloperoxidase (MPO) measurement of the pancreas. Visceral hyperalgesia was also evaluated through the Von Frey test. By 24-h, the levels of pro-inflammatory pancreatic cytokines (IL-1 β , MCP-1, TNF- α and IL-6) and markers of oxidative stress markers (plasma MDA and pancreatic GSH) were measured. The involvement of mast cells and macrophages in nociception was evaluated by depletion of these cells. Modulation of nociception by purinergic receptors was investigated through the use of antagonists: PPADS (non-specific for P2) and BBG (selective for P2X7) given intravenously 30 minutes prior to 24-h evaluation after induction of pancreatitis. The effect of BBG in the CNS was over assessed by intrathecal administration of this drug. Influence of components of inflammasome NLRP 3 was evaluated by the use of C57BL (20-25g) knockout mice for caspase-1, NLRP 3, ASC, IL-1R and IL-18. The results showed that the association between ethanol and POA causes a decrease in the mice's well-being, with significant weight variation and a reduction in survival to 64.7%. Alcoholic pancreatitis caused histopathological changes and increased serum levels of pancreatic enzymes, MPO, pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. These changes occurred with visceral hyperalgesia (ethanol + POA: 3.29 \pm 0.45 g, saline: 15.35 \pm 0.82 g). Macrophages and mast cells are important for the occurrence of hyperalgesia, with the increase of nociceptive thresholds increasing by 28% and 29%, respectively, by cell depletion. The non-specific blockade of purinergic receptors (ethanol + POA + PPADS 12.5 mg / kg: 9.38 \pm 2.30 g, ethanol + POA: 4.4 \pm 0.45 g) and specific blockade of P2X7 (ethanol + POA + BBG 50 mg / kg: 8.14 \pm 0.50 g, ethanol + POA:

3.35 ± 0.49 g) decreases nociception. This effect was still maintained by with intrathecal administration (ethanol + POA + BBG: 8.47 ± 0.92 g, ethanol + POA: 3.52 ± 1.08 g). It has been shown that a deletion of components of inflammasome NLRP 3 (Caspase-1, NLRP 3, ASC, IL-1R and IL-18) reduced visceral hyperalgesia, showing that this pathway an important role in this phenomenon. We conclude that hyperalgesia in acute pancreatitis involves a participation of the purinergic receptors, occurring, at least partially, through the involvement of the inflammasome NLRP 3. In addition, we have shown that macrophages and mast cells contribute significantly to visceral nociception associated to pancreatitis.

Key words: acute pancreatitis, ethanol, inflammasome, nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da patogênese da pancreatite aguda.....	22
Figura 2. Vias de metabolização do etanol – oxidativa e não-oxidativa.....	25
Figura 3. Mecanismo de lesão pancreática com participação dos étil-ésteres de ácidos graxos (FAEEs)	27
Figura 4. Mediadores e receptores associados à dor pancreática.....	29
Figura 5. Esquema das bases neurais da dor referida.....	32
Figura 6. Estrutura molecular do receptor P2X.....	35
Figura 7. Sequência de eventos decorrente da ativação do inflamossoma NLRP3.....	38
Figura 8. Pancreatite alcoólica resulta em perda de peso.....	53
Figura 9. Pancreatite alcoólica induz aumento da amilase sérica.....	53
Figura 10. Pancreatite alcoólica induz aumento da lipase sérica.....	54
Figura 11. Pancreatite alcoólica induz alterações histopatológicas no pâncreas.....	55
Figura 12. Imagens ilustrativas das alterações histopatológicas na pancreatite alcoólica.....	56
Figura 13. Pancreatite alcoólica induz aumento da atividade de MPO no pâncreas.....	57
14. Pancreatite alcoólica induz aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias no pâncreas.....	58
Figura 15. Pancreatite alcoólica induz aumento no nível de marcadores de estresse oxidativo.....	59
Figura 16. Pancreatite alcoólica cursa com hiperalgesia.....	61
Figura 17. Pancreatite alcoólica causa alteração na expressão de c-FOS medular.....	62
Figura 18. Macrófagos participam da hiperalgesia na pancreatite alcoólica.....	64
Figura 19. Mastócitos participam da hiperalgesia na pancreatite alcóolica.....	65
Figura 20. Hiperalgesia na pancreatite alcoólica é modulada por antagonistas purinérgicos.....	67

Figura 21. BBG não alterou as mudanças histopatológicas na pancreatite alcoólica.....	68
Figura 22. Hiperalgisia é modulada pela administração intratecal de BBG.....	69
Figura 23. Curva temporal da hiperalgisia na pancreatite alcoólica no camundongo C57BL.....	70
Figura 24. Deleção gênica da proteína NLRP 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica.....	71
Figura 25. Deleção do componente ASC do inflamossoma NLRP 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica.....	72
Figura 26. Deleção do componente Caspase-1 do inflamossoma NLRP 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica.....	73
Figura 27. Deleção do receptor IL-1R causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica.....	73
Figura 28. Deleção do componente IL-18 do inflamossoma NPLR 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica.....	74
Figura 29. Resumo esquemático da hipótese mecanística para ativação do inflamossoma NPLR 3 na pancreatite alcoólica, levando à hiperalgisia.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina

ADO - adenosina

ANOVA – análise de variância

ASC – proteína *apoptosis-associated speck-like*

ATP – trifosfato de adenosina

BBG – *Brilhant Blue G*

BR – receptor de bradicinina

BRVMR – bulbo raquidiano ventromedial rostral

Ca⁺ - íon cálcio

CCK - colecistocinina

CCKR – receptor ativado por colecistocinina

CEL - lipase carboxil-éster

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DAINES – antiinflamatórios não-esteroidais

DAMPs – padrões moleculares relacionados ao dano

dP - depletado

DRG – gânglios da raiz dorsal

DTNB – ácido 5,5-ditiolbis (2-nitrobenzóico)

EDTA – ácido etilenodiamino-tetra-acético

EPM – erro-padrão da média

EUA- Estados Unidos da América

FA – ácidos graxos

FAEEs- etil-estéres de ácidos graxos

GABA - ácido γ -amino butírico

GSH – glutationa

H⁺ - íon hidrogênio

HE – hematoxilina-eosina

HMG β 1- proteína de alta mobilidade β 1

HR – receptor de histamina

Hsp70 – proteína do choque térmico

HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio

IL - interleucina
K⁺ - íon potássio
LPS - lipopolissacarídeo
MCP-1 – proteína quimioatraente de monócitos tipo 1.
MDA - malonildialdeído
MPO – mieloperoxidase
Na⁺ - íon sódio
NF-κB- fator nuclear κB
NGF – fator de crescimento neuronal
NLRP – receptor do tipo *NOD-like*
NMDV - núcleo motor dorsal do vago
NTS - núcleo do trato solitário
P2X – canal iônico ativado por purinas
P2Y – receptor purinérgico metabotrópico
PA – pancreatite aguda
PAMPs – padrões moleculares relacionados aos patógenos
PAR – receptor ativado por protease
pH – potencial hidrogeniônico
POA- ácido palmitoléico
POAEE - étil éster de ácido palmitoléico
PPADS – ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfonato
PRRs – receptores de reconhecimento de padrões moleculares
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SCPA – substância cinzenta paraquedutal
SDS – dodecil-sulfato de sódio
SNC - sistema nervoso central
SP – substância P
TLR – receptor *Toll-like*
TM – transmembrana
TMP – 1,1,3,3 tetraetoxipropano
TNF-α – fator de necrose tumoral α
TRPA - receptor de potencial transitório para anquirina
TRPV – receptor vanilóide de potencial transitório

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1. 1. 1. Pancreatite Aguda Alcoólica	24
1. 2. 1. Processamento da Dor Visceral e suas Peculiaridades	30
1. 3.1. Receptores Purinérgicos e Nocicepção.....	35
1. 4.1. Inflamossoma NLRP 3 e Pancreatite.....	39
2. JUSTIFICATIVAS	41
3. OBJETIVOS.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4. 2. 1. Protocolo Experimental para a Caracterização das Alterações Inflamatórias na Pancreatite Alcoólica	44
a) Análise histopatológica do pâncreas.....	44
b) Dosagem de lipase e amilase séricas.....	45
c) Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	45
d) Dosagem do malonildialdeído (MDA).....	45
e) Dosagem de glutathiona (GSH)	46
f) Dosagem de Citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1)	46
4. 2. 2. Protocolo Experimental para a Caracterização da Hiperalgisia Mecânica Visceral na Pancreatite Alcoólica	47
a) Teste de Rota Rod.....	47
b) Teste de Hiperalgisia Mecânica Visceral Abdominal	48
c) Avaliação da expressão de c-FOS na medula por <i>Western Blotting</i>	48
4. 2. 3. Investigação do Papel de Macrófagos Peritoneais na Hiperalgisia Visceral na Pancreatite Alcoólica.	49
4.6. Investigação do Papel dos Masticates na Hiperalgisia Visceral na Pancreatite Alcoólica.	50
4.7. Modulação da Hiperalgisia Visceral Decorate da Pancreatite Gaud pesos Receptores Purinérgicos	50
4.8. Modulação da Hiperalgisia Visceral na Pancreatite Alcoólica com Uso de Animais Geneticamente Modificados para Componentes do Inflamossoma NLRP 3.....	51
4.9. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS	52

6. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÃO.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. ANEXOS.....	110

1. 1. PANCREATITE AGUDA

A pancreatite aguda (PA) é definida de acordo com o Simpósio Internacional de Atlanta, em 1992, revisto em 2012 pela *Acute Pancreatitis Classification Working Group*. Consiste de um processo inflamatório agudo do pâncreas, com envolvimento variável de outros tecidos regionais e órgãos remotos, dentre os quais destacam-se o fígado e os pulmões (Bradley, 1993; Banks *et al.*, 2013). Caracteriza-se pela presença no pâncreas de edema, hemorragia, necrose de células acinares e lipídicas, inflamação e infiltração perivascular (Tattersall *et al.*, 2008).

A incidência anual de PA varia de 13 a 45/100.000 indivíduos, sendo esta extensa variabilidade determinada pela desigual distribuição dos fatores de risco para a doença. Os locais com maior distribuição são os Estados Unidos, Europa e Japão (Yadav e Lowenfels, 2013). No Brasil, entre os meses de janeiro de 2015 a janeiro 2016 foram registradas 33.850 internações por pancreatite e outras doenças do pâncreas, que resultaram em 1.896 óbitos no país, sendo a maior incidência na região Sudeste. Esse quadro representou um custo de aproximadamente 26 milhões neste período (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os agentes etiológicos predominantes são os cálculos biliares e o consumo excessivo de álcool, que juntos correspondem a cerca de 75% a 85% dos casos. O abuso de álcool destaca-se como a segunda causa, correspondendo a 36% dos casos em países desenvolvidos (Wang *et al.*, 2009). A pancreatite está relacionada ainda com fatores de origem genética, uso de medicamentos, *Diabetes mellitus* tipo 2, fumo e como complicação após a realização de colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (Yadav e Lowenfels, 2013).

O diagnóstico dessa patologia ocorre na presença de, pelo menos dois dos seguintes características clínicas: dor abdominal (na região epigástrica, sendo grave e persistente, com frequência irradiando-se para as costas), atividade de lipase sérica (ou amilase) pelo menos três vezes o limite superior de normalidade e achados de imagens sugestivos de PA, obtidos através de tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ultrassonografia transabdominal. Os achados de imagens são essenciais quando as enzimas não se apresentam muito

elevadas. O nível de enzimas não tem mostrado relação com a severidade da doença, podendo haver casos fatais mesmo com aumento leve destas (Banks e Freeman, 2006; Bollen *et al.*, 2008; Banks *et al.*, 2013).

Geralmente, a PA é leve e autolimitada, no entanto, cerca de 20% desenvolvem a forma grave da doença, que consiste no aparecimento de complicações locais, tais como necrose e superinfecção, além de sistêmicas, podendo chegar à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. A mortalidade de pacientes com pancreatite alcançou cerca de 10% a 15% em países desenvolvidos (Uhl *et al.*, 2002). Quando associada à disfunção respiratória, renal e hepática, as taxas de mortalidade chegam à 43%, 63% e 83%, respectivamente (Halonen *et al.*, 2002; Hajjar *et al.*, 2012).

Pacientes com a forma leve (sem falência de órgãos ou complicações locais ou sistêmicas) geralmente não precisam de exames de imagem e, frequentemente recebem alta em 3-7 dias após o início da doença. A PA moderadamente grave é caracterizada por falência transitória de um ou mais órgãos (definida como falência de órgãos com duração < 48h), complicações sistêmicas ou complicações locais.

Falência de órgãos inclui insuficiência respiratória, cardiovascular e renal. Complicações sistêmicas são definidas como exacerbações de co-morbidades pré-existentes, incluindo insuficiência cardíaca congestiva, doença hepática crônica e doença pulmonar crônica. Complicações locais incluem a pancreatite intersticial (coleções de fluido peripancreático e pseudocistos no pâncreas) e a pancreatite necrosante (coleções agudas e necróticas). Pacientes com essa apresentação clínica precisam, geralmente, de uma estadia mais longa no hospital e têm uma maior mortalidade que pacientes com PA leve. A forma grave é caracterizada pela presença de falência de um único órgão persistente ou de múltiplos órgãos (presente por tempo \geq 48 h). A maioria dos pacientes que têm insuficiência de órgãos persistente têm necrose pancreática e uma mortalidade de pelo menos 30% (Banks *et al.*, 2013).

A PA severa apresenta duas fases. A primeira, vai do início dos sintomas até o 14^o dia, sendo a necrose do parênquima pancreático e da gordura peripancreática os principais eventos. Há ainda liberação de substâncias tóxicas, vasoativas e de mediadores inflamatórios, que deflagram uma resposta inflamatória sistêmica, levando à disfunção pulmonar, renal e circulatória. Após o 14^o dia, inicia-se uma

segunda fase, na qual surgem complicações sépticas, resultando em necrose pancreática infectada (Xu *et al.*, 2015).

A fisiopatologia da PA trata-se de um complexo processo (Figura 1), ainda não totalmente esclarecido. O mecanismo chave é a lesão de celulares acinares. Estas compõem a porção exócrina do pâncreas, mais extensa, correspondendo por volta de 85% da sua massa total. Através desta porção o pâncreas participa do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras, através da produção de enzimas, dentre as quais se destacam tripsinogênios, quimiotripsinogênios, pré-elastases, calicreinogênios, pré-carboxipeptidases, fosfolipases, nucleases, lipases e amilases (Pandol, 2010).

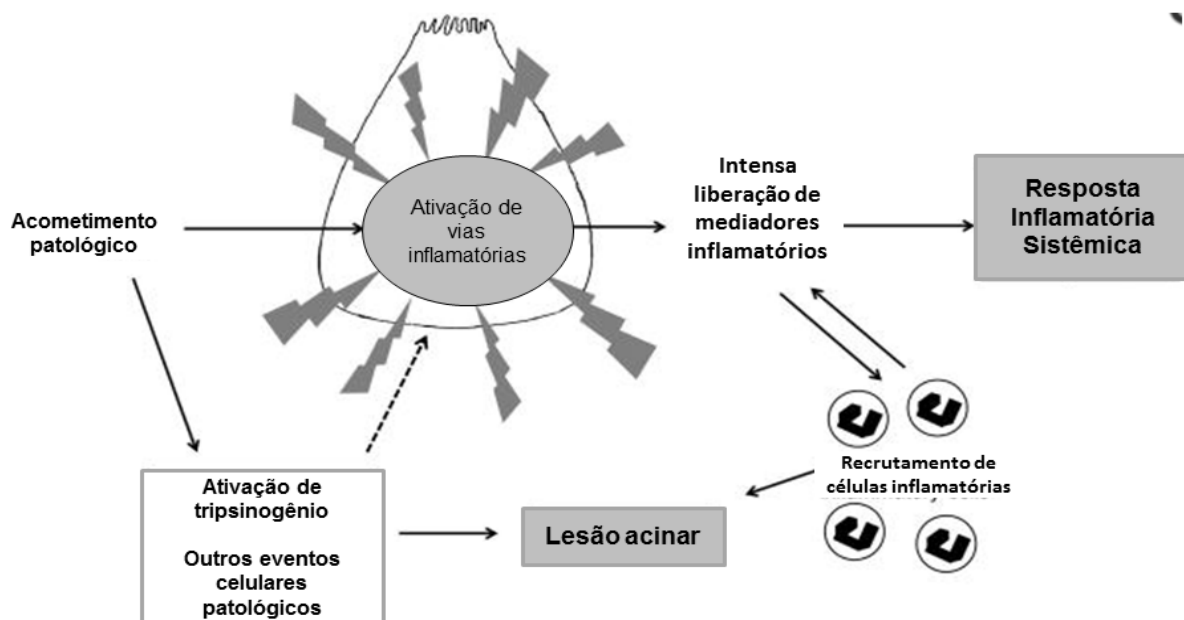


Figura 1. Esquema da patogênese da pancreatite aguda. Fonte: (Sah *et al.*, 2013).

A autodigestão enzimática é um dos mecanismos mais largamente estudados. Por ele, bloqueio na secreção dos grânulos de zimógenos (contendo enzimas digestivas), deflagrado, por exemplo, por obstrução do ducto pancreático, pode propiciar a coalescência desses grânulos com lisossomos. A enzima lisossomal catepsina B é capaz de promover a ativação de tripsinogênio em tripsina, que acumulada leva à ativação de uma cascata de enzimas digestivas, resultando em lesão do parênquima pancreático (Gukovsky *et al.*, 2012).

Outro mecanismo que também levaria à autodigestão seria o bloqueio da exocitose apical fisiológica da célula acinar, levando à exocitose basolateral, o que libera zimógenos ativos no espaço intersticial (ao invés do lúmen acinar), com consequente lesão de membranas celulares induzida por proteases. Esse processo é regulado por cálcio (Raraty *et al.*, 2000; Gaisano *et al.*, 2001).

A lesão de células acinares por processos autodigestivos estimula uma resposta inflamatória, com infiltração de neutrófilos e macrófagos, que leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8, principalmente) no parênquima pancreático e necrose. Contudo, pode haver inflamação independente da ativação de tripsinogênio (Dawra *et al.*, 2011). Macrófagos e mastócitos já foram demonstrados como importantes células na inicialização de inflamação na cavidade peritoneal. Essas células são produtoras de várias citocinas inflamatórias, prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico. Fenômenos nociceptivos da peritonite induzida por ácido acético e zymosan não ocorriam com a depleção destas células, mas que a ação de análogos da PGI₂ não era afetada, sendo esse um mediador que atua diretamente em terminações nociceptivas (Ribeiro *et al.*, 2000).

Estresse oxidativo também é outro mecanismo fundamental na PA. Espécies reativas de oxigênio (ROS) provocam inflamação e desenvolvimento de pancreatite através da degranulação de zimógenos, migração de granulócitos, necrose tecidual e incremento da atividade de amilase e lipase. De fato, ROS, como metabolismo oxidativo e peroxidação, são instantaneamente detoxificados por antioxidantes sob condições normais. Na PA ocorre excesso de produção de ROS e perda da capacidade de neutralizar os ROS, que se acumulam no tecido pancreático (Booth *et al.*, 2011; Armstrong *et al.*, 2013).

Outros mecanismos envolvidos na patogênese na PA já foram identificados, dentre eles, destacamos os distúrbios da microcirculação pancreática e translocação de bactérias do intestino para o tecido pancreático, o que resultaria na sepse (Zhang *et al.*, 2009; Capurso *et al.*, 2012).

Nosso maior interesse nesse estudo é a pancreatite alcoólica, que apresenta fisiopatologia específica, sendo de grande relevância pela elevada prevalência que vem sendo detectado há alguns anos (Goldacre e Roberts, 2004).

1. 1. 1. Pancreatite Aguda Alcoólica

Apesar da gravidade do risco que o consumo de álcool representa no desenvolvimento da PA, a fisiopatologia da pancreatite com essa etiologia ainda não está totalmente compreendida, não existindo tratamento específico. Nem todas as pessoas que consomem álcool excessivamente apresentam PA, sendo necessária a presença de um fator adicional para iniciá-la, que ainda não foi elucidado (Criddle, 2015).

Uma das dificuldades no aprofundamento fisiopatológico dessa doença decorre da carência de modelos experimentais que reproduzam os componentes presentes nos humanos, tornando complexa a translação dos estudos básicos para clínicos. É amplamente conhecido que o uso isolado do etanol não é um modelo confiável para a indução da pancreatite experimental (Schneider *et al.*, 2002).

Agentes adicionais parecem ser necessários para deflagrar a doença, dentre já foram utilizados em modelos experimentais a colecistocinina (CCK) e lipopolissacarídeo (LPS). Vêm sendo atribuída especial atenção às gorduras, sendo estas possivelmente ligadas aos efeitos deletérios do álcool no pâncreas (Dufour e Adamson, 2003).

O etanol causa efeitos tóxicos diretos no pâncreas. Têm efeito de promover alterações no esfíncter de Oddi (Sari *et al.*, 2004). Aumenta a propensão à precipitação de secreções pancreáticas, devido às alterações na litostatina e glicoproteína 2, duas proteínas não-digestivas do suco pancreático, que apresentam propriedades auto-agregantes e aumenta a viscosidade dos fluidos pancreáticos (Niebergall-Roth *et al.*, 1998). Além disso, o etanol aumenta o conteúdo enzimático digestivo e lisossômico e desestabiliza as organelas que contém essas enzimas nas células acinares, facilitando a ativação enzimática prematura (Hirano e Manabe, 1993; Apte *et al.*, 1995). Pelo menos em parte, esses efeitos parecem ser resultantes de seu metabolismo, levando à geração de metabólitos tóxicos e alterando o estado oxidativo intracelular (Criddle, 2015)

O etanol é metabolizado no pâncreas por meio do equilíbrio de duas vias: a oxidativa e a não oxidativa, contudo essa última é bem mais ativa no pâncreas, quando comparado ao fígado (Criddle, 2015). Por meio desta via, o etanol é combinado a um ácido graxo via reações de esterificação de um grupo ácido carboxílico para se obter etil-ésteres de ácidos graxos altamente lipofílicos, os

FAEEs (Diczfalusy *et al.*, 2001). A síntese de FAEEs ocorre por meio de enzimas, amplamente denominadas de FAEEs sintetases, que inclui a lipase carboxil-éster (CEL), largamente expressa nos ácinos pancreáticos e que possui estrutura gênica e sequência de cDNA já elucidadas em humanos (Laposata e Lange, 1986; Lidberg *et al.*, 1992).

A pancreatite ligada ao consumo excessivo de álcool ocorre com aumento dos níveis séricos de CEL tanto em modelos animais quanto em pacientes, sendo, atualmente, considerado um marcador de severidade da doença (Blind *et al.*, 1991). Além de alterar-se quantitativamente, a CEL é re-distribuída durante o adoecimento. Em contraste com a distribuição apical, típica em condições fisiológicas, esta enzima foi detectada no exterior dos grânulos de zimogênio no compartimento citosólico de células acinares pancreáticas necróticas, em torno de lóbulos pancreáticos necrosados e em áreas de necrose de gordura na pancreatite aguda, o que sugere uma capacidade de geração de FAEEs localizada em áreas de danos nos tecidos (Aho *et al.*, 1989). Um estudo demonstrou que FAEEs acumula-se no pâncreas de indivíduos que morreram após intoxicação alcoólica aguda, em contraste com outros órgãos comumente danificados pelo álcool, tais como cérebro e coração (Laposata e Lange, 1986).

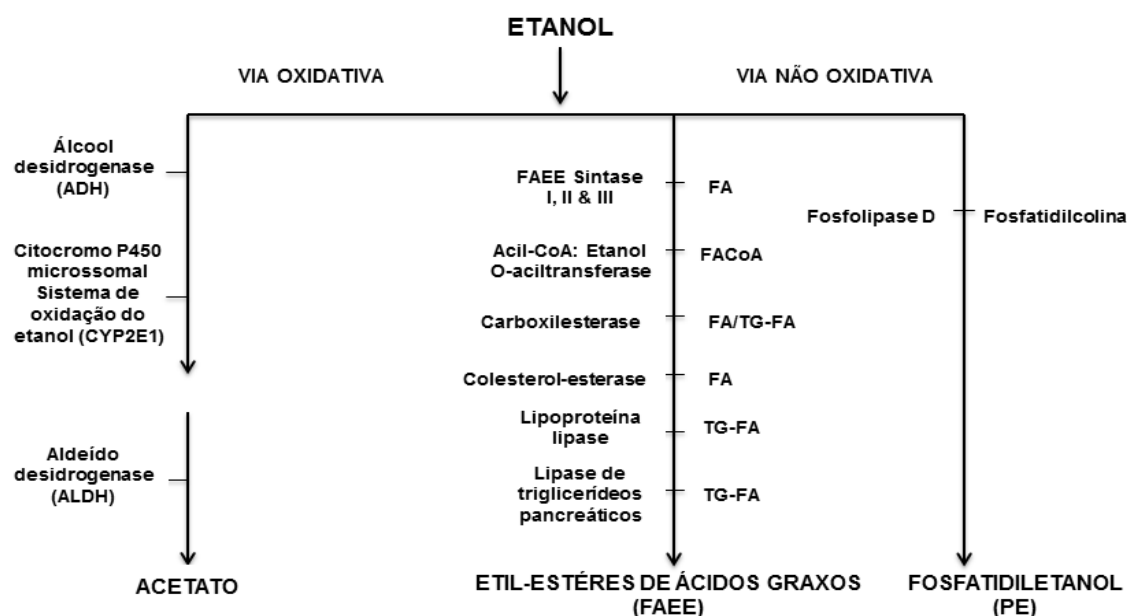


Figura 2. Vias de metabolização do etanol – oxidativa e não oxidativa. Fonte: (Best e Laposata, 2003).

Houve correlação positiva dos níveis de FAEEs pancreáticos, entre os quais está o étil-éster de ácido palmitoléico (POAEE), com níveis de etanol no sangue, sugerindo o potencial desses metabólitos não-oxidativos estarem mediando os efeitos tóxicos do consumo excessivo do etanol (Doyle *et al.*, 1994). Isso foi verificado também em seres humanos, nos quais foram encontradas concentrações altas de FAEEs no sangue até 99 h após a ingestão de etanol em bebedores de elevada intensidade. Essa via deve estar em equilíbrio com a via oxidativa, já que em experimentos com a inibição da via oxidativa, a não-oxidativa foi potencializada (Borucki *et al.*, 2007).

Os efeitos tóxicos *in vivo* diretos dos FAEEs sobre o pâncreas foram primeiramente demonstrados por Werner e colaboradores, que fizeram experimentos administrando o étil-palmitato, um éster-etílico de ácido graxo saturado, intra-arterial em ratos. Este estudo demonstrou a ocorrência de alterações típicas de pancreatite aguda, incluindo edema, ativação de tripsinogênio e vacuolização das células acinares pancreáticas. Paralelamente, nenhuma alteração foi encontrada no fígado, pulmão, coração, músculo esquelético e gordura subcutânea (Werner *et al.*, 1997). Subsequentemente, este mesmo grupo mostrou que a administração intravenosa de etanol foi capaz de promover dano específico no pâncreas, sendo associado com aumento da concentração de FAEEs plasmática e pancreática. A inibição da via oxidativa exacerbou efeitos tóxicos do etanol (Werner *et al.*, 2002).

Recentemente, foi desenvolvido um modelo de pancreatite aguda em camundongos, que será utilizado como referência nos protocolos experimentais realizados nesse trabalho. Esse modelo baseia-se na ativação do metabolismo não-oxidativo, sendo, para isso, necessária a aplicação de injeções intraperitoneais de um metabólito da via não-oxidativa, o ácido palmitoléico (POA) e o etanol. Esse modelo cursa com alterações histológicas pancreáticas (necrose, edema e inflamação), indicativas de pancreatite aguda, bem como alterações de marcadores bioquímicos, incluindo tripsina, amilase e mieloperoxidase pancreáticas, além de aumento de IL-6 plasmática. A lesão pancreática relaciona-se à um desbalanço no cálcio citosólico, que, conseqüentemente, leva a um importante dano mitocondrial (Figura 3) (Huang *et al.*, 2014). Alterações nociceptivas ainda não foram estudadas nesse modelo, sendo estas o principal propósito deste trabalho.

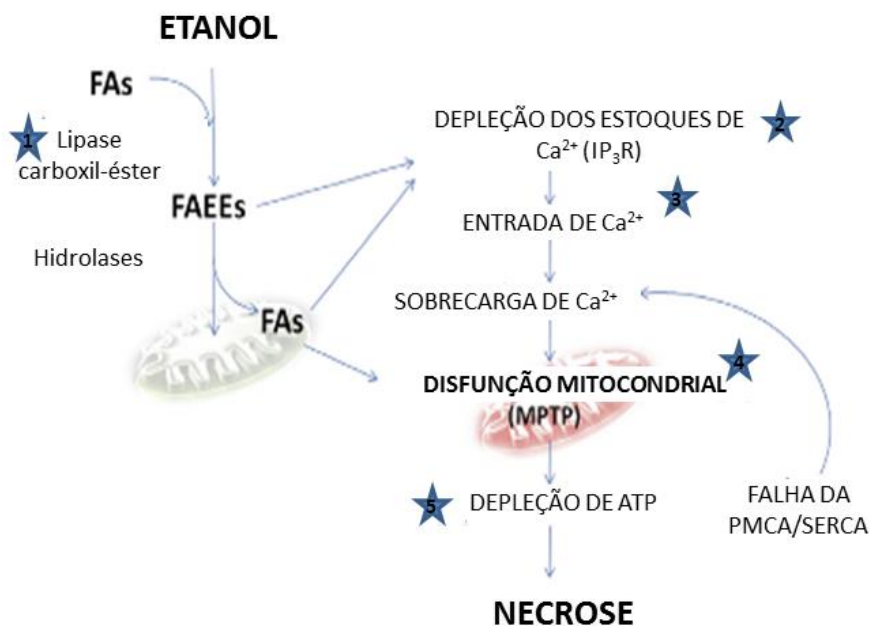


Figura 3. Mecanismo da lesão pancreática com participação dos ácidos graxos (FA) e dos étil-ésteres de ácidos graxos (FAEEs). Fonte: (Criddle, 2015).

1. 2. DOR NA PANCREATITE AGUDA

A dor abdominal é o mais precoce e frequente sintoma da PA, estando presente em cerca de 94% dos pacientes, sendo, geralmente o fator que demanda necessidade de atendimento médico (Skipworth *et al.*, 2010). Tipicamente, localiza-se no abdômen superior, comumente na região epigástrica, e pode se irradiar para as costas (Cervero, 2009; Porto, 2012).

Os fatores que inicialmente ativam as vias de dor na pancreatite ainda não estão claros. Há fortes evidências de que a digestão do tecido adiposo retroperitoneal por extravasamento de lipase e fosfolipase A2 possa desencadear fatores inflamatórios locais e levar à geração de estímulos nociceptivos. Além disso, a obstrução ductal por cálculos biliares ou compressão do ducto pancreático por pseudocistos no curso da doença também poderiam levar à geração de dor. Necrose pancreática está fortemente associada a uma alta morbidade e excruciante dor. É provável ainda que ocorram danos nas terminações nervosas periféricas, gerando-se estados de dor neuropática (Mayerle *et al.*, 2004; Bhatia *et al.*, 2005; Lindsay *et al.*, 2005; Scholz e Woolf, 2007).

O tratamento da dor pancreática se faz mediante o uso de antiinflamatórios não-esteroidais (DAINES) para dor moderada e, narcóticos, para dor severa. O manejo da dor pancreática não se fundamenta no conhecimento da neurofisiologia desse fenômeno, que ainda permanece com muitas lacunas com respeito aos receptores e canais nos neurônios aferentes (pancreáticos e na medula espinhal) e aos mediadores químicos envolvidos nesse processo. Isso se reflete na clínica pela limitação no controle efetivo da dor e de ausência de tratamentos específicos para a dor visceral oriunda dessa condição clínica (Barreto e Saccone, 2012).

As vias parassimpáticas e simpáticas desempenham papel importante na transmissão do estímulo doloroso pancreático. A literatura vem mostrando que, no trato digestivo, as vias não dolorosas são primariamente conduzidas pelo vago, ao passo que, as vias dolorosas, estão em nervos espinhais (esplânicos). Adicionalmente, gânglios intrapancreáticos e neurônios enteropancreáticos estão envolvidos na inervação do pâncreas, sem contudo ter sido elucidado o papel dessas estruturas no processamento da dor (Barreto e Saccone, 2012).

Já foram demonstradas a influência de várias áreas do SNC (sistema nervoso central) de projeções pancreáticas já foram demonstradas, mais especificamente do córtex pré-frontal, do núcleo motor dorsal do vago (MDV) e do núcleo do trato solitário (NTS). Sabe-se ainda que existem interações parassimpáticas-simpáticas entre as colunas intermediolaterais e interneurônios das lâminas I e IV da medula espinhal (Buijs *et al.*, 2001).

Estudos com murinos vem demonstrando o papel do NGF (fator de crescimento neuronal), bem como de outras neurotrofinas nas mudanças plásticas que ocorrem com neurônios aferentes no aparecimento e progressão da PA, mediando a sensibilização periférica e a sinalização de dor (Kim *et al.*, 2004). Foi demonstrado em modelos com ratos que a PA produz hipersensibilidade mecânica associada com o aumento da fosforilação da tirosina quinase A e aumento da expressão de CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e pré-protocininas em DRG (gânglios da raiz dorsal) torácica. As alterações de CGRP e SP (substância P) no DRG parecem ser conduzidas, pelo menos em parte, pelo NGF (Winston *et al.*, 2005).

O envolvimento de muitos receptores e mediadores já foi demonstrado (Figura 4), tais como os receptores de taquicinina, os vanilóides de potencial transitório (TRPV) tipo 1 e 4, o receptor de potencial transitório para ankirina (TRPA)

tipo 1, o receptor ativado por proteases (PAR) tipo 2, vários subtipos de receptores (1A, 1D, 2A e 3A) para a 5-hidroxitriptamina (5-HT), o receptor ativado pela colecistoquinina tipo B (CCKBR), o canal iônico ativado por purinas (P2X) tipo 2 e os receptores ativados por histamina (HR), bradicinina (BR) e os receptores canabinóides (Barreto e Saccone, 2012).

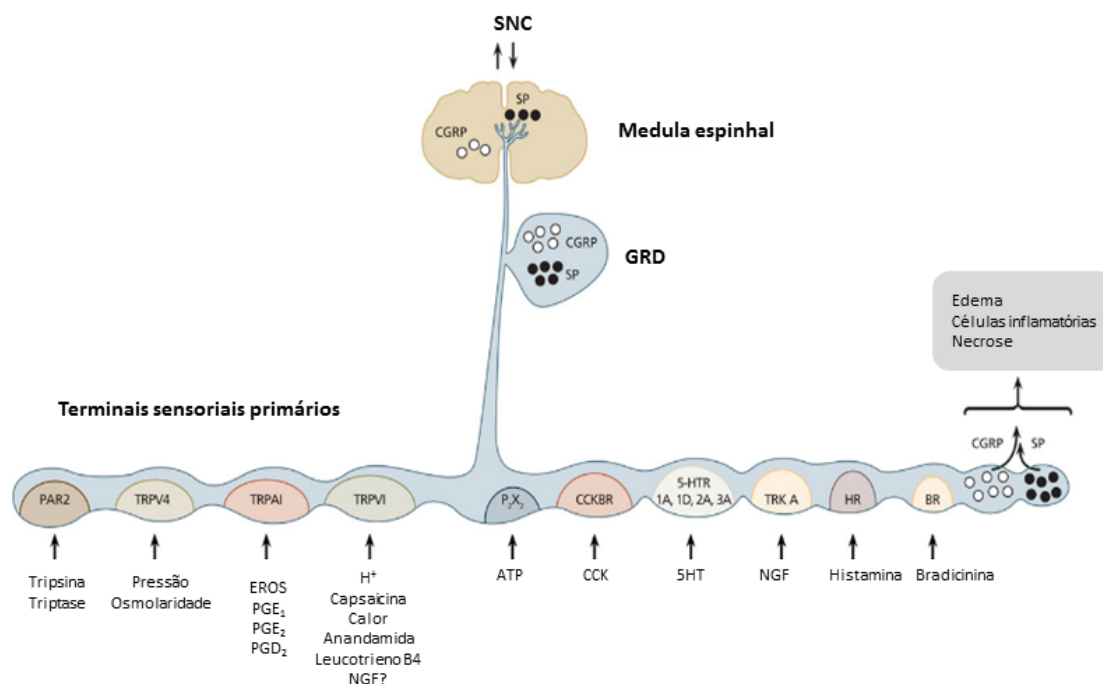


Figura 4. Mediadores e receptores associados à dor pancreática. Fonte: (Barreto e Saccone, 2012).

Contudo, nenhum dos estudos explorando aspectos nociceptivos utilizou modelo de pancreatite alcóolica e o papel de receptores purinérgicos na nocicepção pancreática é ainda pouco explorado, sendo esses dois pontos propósitos desse estudo.

A dor pancreática encaixa-se dentro da categoria de dor visceral, que consiste na sensação nociceptiva que acomete órgãos internos. A dor visceral ainda não é eficientemente compreendida, e apresenta características peculiares que a distingue da dor somática e a aproximam mais da dor somática profunda (Porto, 2012).

1. 2. 1. Processamento da Dor Visceral e suas Peculiaridades

Uma das peculiaridades da dor visceral é o fato de a mesma não ser evocada em todos os órgãos com a mesma magnitude. Órgãos sólidos, como o fígado e rim tem pouca sensibilidade. Nem sempre tem direta relação com lesão tecidual e com a gravidade desta. Um bom exemplo para essa característica é visto no intestino: o corte do mesmo não evoca dor, contudo o estiramento do mesmo provoca intensa sensação dolorosa. A dor visceral apresenta-se com uma evolução temporal e manifesta-se de forma variável a depender da fase da patologia que a origina, dentre outros fatores, tais como, o envelhecimento e gênero (Cervero e Laird, 1999; Porto, 2012).

A dor visceral segue o processamento bem similar ao da dor somática, ocorrendo em três níveis: periférico, espinhal e sítios centrais (Neto, 2009).

A nível periférico, existem terminações nervosas aferentes livres receptivas (nociceptores) são responsáveis pela captação desses estímulos. Consistem em terminações nervosas livres de neurônios sensoriais primários e dividem-se em quatro classes: os mecânicos, que respondem às variações de pressão; os térmicos, que são sensíveis às temperaturas extremas ($>45^{\circ}\text{C}$ ou $<5^{\circ}\text{C}$); os químicos, responsivos aos mediadores químicos, e os polimodais, que são responsivos aos três tipos de estímulos noxios (Chen *et al.*, 1996).

Os nociceptores relacionados com as fibras C (amielínicas), respondem aos estímulos mecânicos, térmicos e/ou químicos, enquanto os relacionados com as fibras A δ (mielínicas) à estimulação mecânica, preferencialmente. É assumido que os nociceptores A δ medeiam a primeira dor, caracterizada por ser rápida, aguda e pontual, enquanto os nociceptores C, a segunda dor, atrasada, difusa e fraca (Julius e Basbaum, 2001).

Existe ainda uma porção de fibras C (em torno de 10-20% destas) que apresenta altos limiares de ativação, chamadas de “silenciosas” ou “dormentes”, já que, fisiologicamente, não respondem aos estímulos nocivos agudos. Contudo, na vigência de um processo inflamatório, são sensibilizadas e/ou ativadas por vários mediadores inflamatórios, tornando-se responsivas em baixos limiares. Há evidências de que esse tipo de nociceptores seja particularmente importante nas vísceras (Cervero *et al.*, 1994).

Existem duas categorias de nociceptores viscerais no que se refere às suas propriedades funcionais. A primeira é composta de nociceptores de alto limiar para estímulos naturais (em sua maior proporção, mecânicos) e podem ser ativados por estímulos potencialmente nocivos. Uma segunda classe de nociceptores possui a capacidade de codificar a intensidade do estímulo. Apresentam baixo limiar para estímulos naturais. Variam a magnitude de suas descargas em resposta à intensidade do estímulo detectada. Ambos já foram encontrados em vários órgãos internos (Cervero e Janig, 1992; Besson *et al.*, 1994).

Os aferentes nociceptivos viscerais são frequentemente bilaterais, e não unilaterais, como os somáticos. Tal fato, associado à extrema ramificação dos nervos viscerais (um mesmo nervo participa da inervação de diversas vísceras), ao número relativamente pequeno de aferentes viscerais (correspondendo apenas a 10% das fibras da raiz dorsal), ao proporcionalmente elevado número de fibras C, de condução lenta nos nervos viscerais (1 fibra A para 10 fibras C) e à chegada dos aferentes viscerais de uma mesma víscera em múltiplos segmentos medulares, justificam a baixa precisão da dor visceral em termos de localização e qualificação (Porto, 2012).

Já foi elucidado na nocicepção visceral importante papel das vias aferentes amielínicas e de fino calibre, que contêm neurônios peptidérgicos, que utilizam a SP e o CGRP como neurotransmissores. Contudo, não se exclui a possibilidade de que as fibras que não expressam esses peptídeos possam também ser importantes, tendo em vista as vastas lacunas ainda existentes no mecanismo dessa modalidade de dor (Snider e McMahon, 1998).

Os nociceptores periféricos situam-se nas terminações periféricas de neurônios primários cujos corpos celulares formam os gânglios das raízes dorsais e terminam no corno dorsal da medula, transmitindo a informação a neurônios secundários. O corno dorsal pode ser dividido em seis lâminas de acordo com as características dos seus neurônios, existindo uma correspondência anatomo-funcional. Os neurônios nociceptivos estão localizados nas lâminas I e II e na lâmina V, também responsivas aos estímulos não nociceptivos (Almeida *et al.*, 2004).

A dor visceral pode ser percebida em outras localizações, por vezes bem distante anatomicamente com o órgão que desencadeou o estímulo, fenômeno denominado dor referida. A explicação mais aceita para esse fenômeno é a convergência de impulsos dolorosos viscerais e somáticos (Figura 5), superficiais e

profundos, para neurônios nociceptivos comuns localizados no corno dorsal da medula espinhal, sobretudo na lâmina V (Neto, 2009; Porto, 2012).

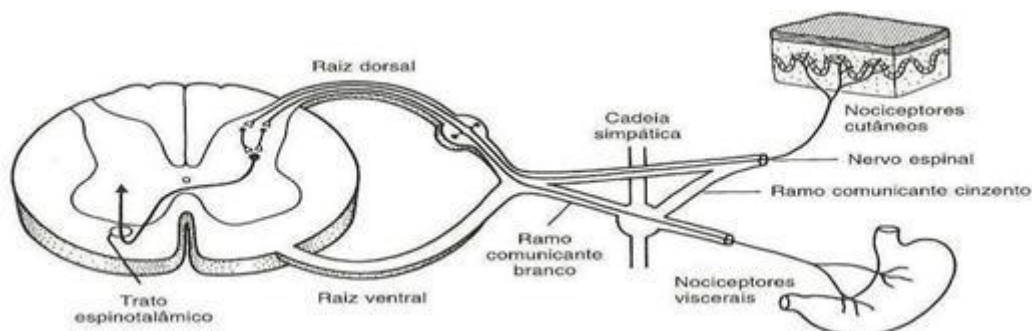


Figura 5. Esquema das bases neurais da dor referida. Sobre um mesmo neurônio do corno posterior da medula espinhal convergem aferências nociceptivas cutâneas e viscerais, as quais são reconhecidas pelo SNC como originadas na pele. Fonte: (Cingolani e Houssay, 2004).

Os dois principais trajetos sensoriais ascendentes da medula espinhal envolvidos na transmissão da dor são o sistema espinotalâmico e o sistema espinorreticular (Millan, 1999). O trato espinotalâmico representa a via mais importante, onde axônios de neurônios espinais de segunda ordem, cruzando a linha mediana, ainda na medula, ascendem pelo quadrante ântero-lateral da substância branca, projetando-se ao tálamo. Nessa via, o complexo ventrobasal do tálamo, área de terminação das fibras de medula espinhal, projetar-se, ainda, para a área somatossensitiva do córtex. O trato espinorreticular termina em neurônios da formação reticular bulbar e pontina, que processam e retransmitem essa informação ao tálamo e a outros núcleos diencefálicos. Outra via importante é a representada pelo trato espinomesencefálico, que termina em algumas regiões do mesencéfalo, onde se incluem a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal. Essa última região mantém conexões recíprocas com o sistema límbico, por intermédio do hipotálamo (Russo e Brose, 1998). Em 1990, Willis e colaboradores descreveram uma via exclusiva de condução da dor visceral, localizada na porção mais anterior e medial do funículo posterior (Porto, 2012).

A via descendente dirige-se em sentido diametralmente oposto ao da via sensitiva ascendente, exercendo um efeito inibitório e modulador sobre estruturas distais, muito particularmente sobre o cordão posterior da medula, onde o balanço

entre aferências nociceptivas e não nociceptivas pode controlar a transmissão de informação nociceptiva para centros superiores (Melzack e Wall, 1965).

Está estabelecido que os *inputs* nociceptivos espinhais estejam sujeitos a influências modulatórias supraespinhais. Estes sistemas endógenos podem ser ativados por vários estímulos, como por exemplo, o *stress*, um estado de doença, comportamento cognitivo ou mesmo pela dor (Urban e Gebhart, 1999). Uma destas vias, a mais estudada, liga a amígdala, o hipotálamo e o tronco cerebral, controla a resposta nociceptiva dos neurônios do corno dorsal e é sensível a opióides. Vários locais podem ser estimulados, em particular o tronco cerebral, tendo como resultado a analgesia. Atuando dessa forma, podemos citar a substância cinzenta periaqueductal (SCPA), o *locus coeruleus* e o bulbo raquidiano ventromedial rostral (BRVMR) (Kandel, 2013).

A dor visceral, quando comparada à somática, associa-se com maior frequência aos reflexos motores e aos fenômenos autonômicos, tais como, transpiração profusa, náusea, distúrbios gastrintestinais, alterações da temperatura corporal, da frequência cardíaca e da pressão arterial (Cervero e Laird, 1999; Sikandar e Dickenson, 2012).

As lacunas existentes no conhecimento da dor visceral, sobretudo pancreática, abrem caminhos para possibilidade de muitas vias de modulação. A via purinérgica vem se mostrando promissora, tendo sido demonstrada sua participação em processos dolorosos em várias vísceras, tais como bexiga, ureter, intestino e útero (Burnstock, 2012). Tanto a molécula sinalizadora dessa via, o ATP (trifosfato de adenosina), quanto os receptores purinérgicos se apresentam largamente distribuídos no pâncreas, regulando funções endócrinas e exócrinas, estando presente em situações fisiológicas ou patológicas (Burnstock e Novak, 2012). Nenhum estudo em pancreatite alcoólica explorou o envolvimento desta via na nocicepção.

1. 3. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

A sinalização purinérgica é uma rota comum de comunicação célula-célula, envolvida em muitos mecanismos neuronais e não-neuronais e em eventos de curta duração, incluindo repostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária,

vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (Agteresch *et al.*, 1999; Hoebertz *et al.*, 2003; Burnstock e Knight, 2004).

O ATP, molécula sinalizadora do sistema purinérgico, é um nucleotídeo trifosfato existente em todas as células, estando envolvido na regulação de vários processos fisiopatológicos, mediante sua ação no meio extracelular. É armazenado em vesículas nas terminações sinápticas e, após despolarização neuronal, é liberado para interagir com receptores de membrana, denominados purinoreceptores (Burnstock, 1972; 1976; Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP pode, ainda, ser liberado juntamente com vários neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina e ácido γ -amino butírico (GABA) (Burnstock, 2004; Pankratov *et al.*, 2009).

A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico ou em respostas a danos celulares, como hipóxia e lesões. Em situações patológicas, a liberação de ATP e a expressão de receptores purinérgicos pelas células são consideravelmente aumentadas (Burnstock, 2009). Como este nucleotídeo não é capaz de atravessar as membranas biológicas por difusão ou transporte ativo, o controle de sua concentração extracelular é realizado pela ação das ectonucleotidases que catalisam sua conversão em adenosina (ADO) (Bonan *et al.*, 2000; Wink *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos que identificaram os receptores purinérgicos realizaram-se no ano de 1978, com a distinção em dois grupos: P1 e P2, que respondiam à ADO e ao ATP, respectivamente. Em 1985, os receptores P2 foram classificados em dois grupos: P2X e P2Y, sendo somente o segundo responsivo à adenosina 5'-difosfato (ADP). Em 1994, Abbracchio e Burnstock agregaram a essa classificação conhecimentos acerca da estrutura molecular e mecanismo de ação desses receptores. Os P2X eram os receptores ionotrópicos, e os P2Y, metabotrópicos (Burnstock, 2007). Esse estudo explorou o envolvimento dos receptores P2X.

Os receptores P2X (Figura 6) são canais iônicos catiônicos não-seletivos que atravessam a bicamada lipídica. São permeáveis à Na^+ , K^+ e alguns ao Ca^{+2} . As subunidades que formam esse receptor são compostas por duas α -hélices transmembranas (TMI e TMII), unidas por uma longa alça extracelular. Os terminais amino e carboxil encontram-se voltados para o intracelular. O poro do canal é formado por regiões no TMII. O sítio de ligação do ATP está na alça extracelular,

adjacente aos TMs. Sete subunidades foram clonadas e sequenciadas (P2X1-P2X7), havendo de 30% a 50% de identidade entre elas. Conjectura-se que o canal seja um trímero dessas subunidades, podendo ser homoméricas ou heteroméricas (Khakh, 2001).

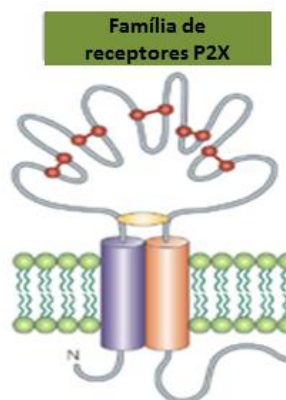


Figura 6. Estrutura molecular do receptor P2X. Fonte: (Khakh, 2001).

1. 3.1. Receptores Purinérgicos e Nocicepção

Grandes quantidades de ATP podem deixar o espaço intracelular em resposta a traumas de tecido, tumor, inflamação, enxaqueca ou distensão visceral (Burnstock, 1996). A ativação consequente do receptor P2X é passível de contribuição à sensação de dor intensa nestas condições. Além de o ATP ser um importante receptor na transmissão noradrenérgica neuronal periférica e central (Poelchen *et al.*, 2001). Sua liberação pós-ganglionar pode contribuir para manter a condição de dor simpática. Tem havido interesse nesses mecanismos periféricos de ATP devido a descoberta de que um subtipo P2X3 é expresso com considerável seletividade por um subconjunto de neurônios sensoriais nociceptivos em gânglios da raiz dorsal (Chen *et al.*, 1995). Além de o ATP ser reconhecido como “molécula de dor” no lançamento periférico (Burnstock, 2001; Liu e Salter, 2005).

Estudos relacionados a localização dos receptores P2X, confirmaram a presença de seis pelo menos subtipos (P2X1-P2X6) em estruturas nervosas com envolvimento na transmissão nociceptiva (Brandle *et al.*, 1998; Brandle *et al.*, 1999). Encontram-se presentes também nos gânglios sensoriais (Khakh, 2001). A ativação de certos tipos de receptores P2X por ATP demonstra ser um fator importante em

vários estados da dor; particularmente os subtipos P2X3 e P2X2 configuram-se como alvos no tratamento de patologias inflamatórias, dor visceral e provavelmente dor neuropática (Chizh e Illes, 2001).

No que diz respeito ao envolvimento desses receptores com pancreatite aguda, há apenas um estudo mostrando que os receptores P2X7 e o receptor *Toll-like* 9 (TLR 9), presumivelmente em macrófagos pancreáticos, são receptores importantes na mediação de sinais inflamatórios em pancreatite induzida por ceruleína (Hoque *et al.*, 2011). De acordo com esse trabalho, esses receptores ativam o inflamassoma NLRP 3 nessas células residentes, sendo esse um ponto chave no desenvolvimento da resposta inflamatória. No entanto, não foram explorados aspectos nociceptivos.

Foi gerada, então, a hipótese de que esse mesmo processo tivesse importância nas alterações nociceptivas no recente modelo de PA alcoólica utilizado nesse estudo, tendo as células residentes como principais mediadoras, atuando via ativação do inflamassoma NLRP 3.

1.4. INFLAMOSSOMA NLRP 3

O termo inflamossoma é originado da palavra inflamação, que reflete a função desse complexo e o sufixo “soma”, oriundo da palavra grega *soma*, que significa corpo, frequentemente utilizada em biologia celular e molecular para definir entidades ou complexos moleculares, como proteossomas, lipossomas, ribossomas, dentre outros. Portanto, inflamassomas são complexos multiprotéicos capazes de recrutar e ativar a caspase-1. São formados pela proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) (Martinon *et al.*, 2002; Martinon e Tschopp, 2007).

São conhecidos seis inflamassomas distintos: o inflamossoma NLRP1, NLRC4/IPAF, NLRP6, NLRP12, A2M (um membro da família das proteínas HIN200) e NLRP3/NALP3, sendo a associação deste último com a nocicepção presente na pancreatite alcoólica investigada nesse estudo (Chamaillard *et al.*, 2003; Becker e O'Neill, 2007; Benko *et al.*, 2008).

Após o reconhecimento de seus respectivos ligantes, os receptores *NOD-like* (NLRs) recrutam a proteína adaptadora ASC através de interações homofílicas PYD-PYD. ASC contém uma região amino-terminal PYD e uma C-terminal CARD

que permite o recrutamento das caspases inflamatórias, especialmente caspase-1, por meio da interação CARD-CARD. Há, no entanto, inflamassomas que ativam a caspase-1 de maneira independente de ASC, como o inflamossoma NLPR1 e o NLRC4/IPAF. Existe, ainda, uma via não canônica do inflamossoma envolvendo uma protease relacionada à caspase-1, denominada caspase-11. Alguns trabalhos mostram que a caspase-11 seja dispensável para a ativação da caspase-1 após estimulação com ativadores canônicos de NLRP 3, tais como o ATP e a nitroglicerina. A ativação de muitos inflamassomas é crítica para a maturação de diversas citocinas pró-inflamatórias (Chamaillard *et al.*, 2003).

O NLRP 3 é, até o presente momento, o melhor estudado, participa na formação do inflamossoma através do recrutamento de ASC e subsequente ativação de caspase-1, que promove maturação de IL-1 β e IL-18 (Figura 7). Pode ser ativado por variados tipos de estímulos, tais como, padrões moleculares relacionados aos patógenos (PAMPs), sinais endógenos e de origem ambiental. É capaz de monitorar os níveis de DAMPs (padrões moleculares associados aos danos), como consequência de injúria tecidual ou celular, mediada por toxinas ou agentes infecciosos (Ogura *et al.*, 2006; Sutterwala *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2009).

De forma peculiar, o NLRP 3 tem capacidade de responder a uma vasta quantidade de agonistas, sobretudo sinais endógenos de origem não microbiana, nos processos inflamatórios estéreis. Respondem à mudanças nas concentrações iônicas celulares, especialmente de K⁺. Há também ativação NLRP 3 em resposta à cristais de urato, ATP extracelular e β -amilóide (Benko *et al.*, 2008).

De forma diferente dos outros inflamassomas, NLRP 3 é expresso em baixas quantidades em células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Sabe-se que um aumento na expressão de NLRP 3 mediado pela ativação do NF- κ B é crítico para a ativação desse inflamossoma (Bedoya *et al.*, 2007).

Tem sido propostos três distintos mecanismos para a ativação do NLRP 3 (Figura 7). O primeiro envolve o efluxo de K⁺ através do receptor purinérgico P2X₇, outros canais iônicos e toxinas formadoras de poros (nitroglicerina, maitotoxinas e hemolisinas). Esses canais e toxinas também modulam H⁺, Na⁺ e Ca⁺², sugerindo que o fluxo geral de íons possa ativar NLRP 3 (Bedoya *et al.*, 2007).

O segundo mecanismo é ativação do NLRP 3 mediada pelos radicais livres de oxigênio (ROS). Diversos ativadores de NLRP3, tais como ATP, nigericina, sílica, alume, ácido úrico induzem a produção de ROS em macrófagos e monócitos (Cruz *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2012). Entretanto, a sinalização de TLRs induz a produção de ROS, mas ainda assim falha em ativar o inflamossoma de NLRP3 na ausência de um segundo estímulo. Concomitantemente, estudos demonstram que ROS mitocondrial participa na *up regulation* de transcritos de NLRP 3 e pró-IL-1 β mediado por NF- κ B ao invés de ativar o inflamossoma de NLRP 3 (Bauernfeind *et al.*, 2011)(BAUERNFEIND *et al.*, 2011; BULUA *et al.*, 2011).

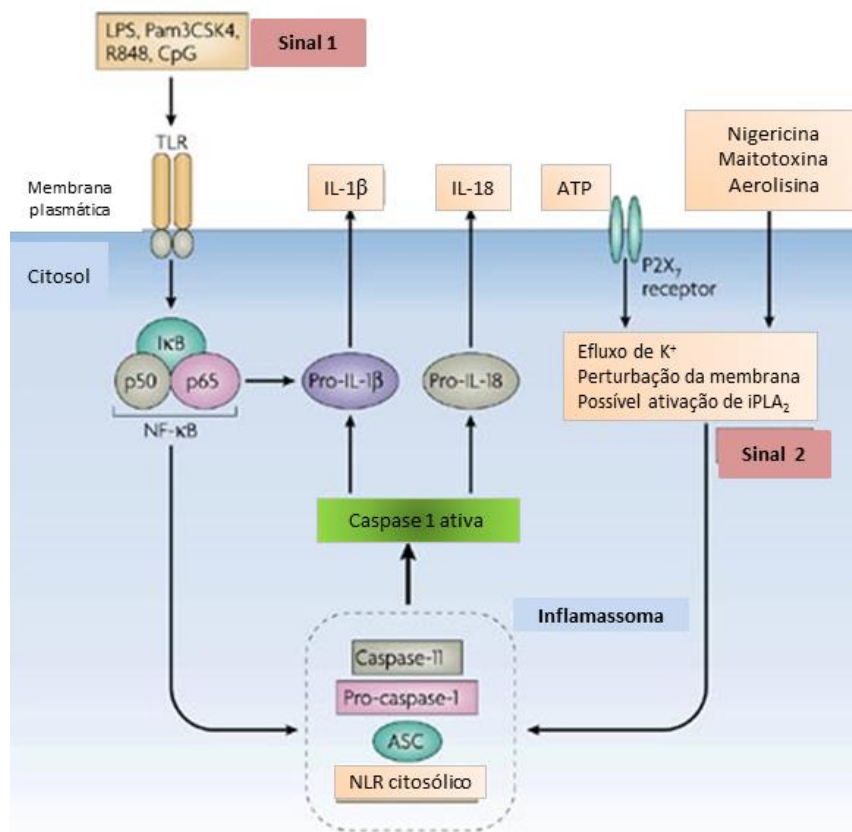


Figura 7. Sequência de eventos decorrente da ativação do inflamossoma NLRP 3. Sinal 1 – ação mediada pelo receptor TRL via NFκB. Sinal 2 – alteração no efluxo de K⁺ mediada pelo receptor P2X7. Fonte: (Tschopp e Schroder, 2010).

O terceiro mecanismo propõe que a desestabilização da membrana fagolisossomal e liberação citosólica de catepsinas lisossomais ativa NLRP 3. A fagocitose de moléculas particuladas e cristalinas pode causar dano à membrana lisossomal, e conseqüentemente levar ao extravazamento de catepsinas lisossomais para o citosol. Produtos gerados a partir da atividade proteolítica das

catepsinas no citosol podem então ativar o inflamossoma de NLRP 3. É proposto que o processamento de componentes citoplasmáticos pela catepsina B age “*upstream*” da ativação de NLRP 3 induzida por sílica, alume e amiloide- β (Halle *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008). Além disso, a liberação de catepsina B está diretamente relacionada à ativação de caspase-1 pelo ionóforo nigericina (Hentze *et al.*, 2003), sugerindo um mecanismo único para a ativação de NLRP 3 por estímulos particulados e não particulados. Entretanto, foi demonstrado que a ativação do inflamossoma de NLRP 3 não foi afetada em macrófagos deficientes de catepsina B estimulados com hemozoína, cristais de ácido úrico, sílica e alume, sugerindo uma redundância com outras catepsinas ou outras vias que levam à ativação do NLRP 3 (Dostert *et al.*, 2009; Tschopp e Schroder, 2010). No entanto, um mecanismo unificador que poderia explicar como o inflamossoma de NLRP3 é ativado permanece desconhecido.

1. 4.1. Inflamossoma NLRP 3 e Pancreatite

O início da pancreatite é caracteristicamente estéril e resulta em necrose de células acinares. Conteúdos intracelulares proveniente de células danificadas são liberados no espaço extracelular, atuando como DAMPs, que deflagram inflamação (Iyer *et al.*, 2009).

O papel de muitos DAMPs tem sido descrito na pancreatite aguda, atuando na lesão pancreática, na lesão remota e na resolução da doença. Dentre eles, destacam-se ácidos graxos saturados livres, grupo de proteínas de alta mobilidade do tipo 1 (HGMB1), DNA, ATP e proteína do choque térmico 70 (hsp70). Muitos desses DAMPs já foram detectados em humanos com pancreatite (Hoque *et al.*, 2012).

Existe uma família de receptores especializada no reconhecimento específico de padrões moleculares (PRRs), sendo capazes de deflagrar uma resposta imune focada para um patógeno em particular. Receptores para PRRs são capazes de ser ativados por DAMPs. A família melhor caracterizada é a dos receptores Toll-like (TLRs). Já foi demonstrado que os TLRs podem ser ativados por DAMPs. O DNA mitocondrial já foi identificado como um ativador de TLR9 (Chen e Nunez, 2010). Após a injúria de um órgão, DAMPs são liberados no espaço extracelular e podem

ativar mesmos receptores de identificação de bactérias e outros agentes infecciosos, sem a presença destes, caracterizando a “inflamação estéril” (Piccinini e Midwood, 2010), o macrófago é uma célula sinalizadora importante (Hoque *et al.*, 2011).

Uma resposta inflamatória estéril exige pelo menos dois distintos sinais em células inflamatórias. O primeiro ocorre através da ativação de TLRs presentes na membrana plasmática ou no endossoma. A ativação destes induz o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas pró-IL1- β e pró-IL-18 (Chen e Nunez, 2010; Hoque *et al.*, 2012).

Outra via consiste na ação de DAMPs em receptores de membrana plasmática (P2X7) e receptores citosólicos da família Nod-like (NLR), com a subsequente ativação de um complexo de proteínas citosólicas, denominadas de inflamossomas, que regulam a maturação proteolítica da caspase-1 (Benko *et al.*, 2008; Yazdi *et al.*, 2010). A caspase-1 já foi previamente identificada como uma enzima conversora de interleucina, que regula fortemente a conversão das citocinas pró-IL1- β e pró-IL-18 em suas formas maduras (Yazdi *et al.*, 2010).

Esses dois caminhos levam a ativação de componentes do inflamossoma NLRP 3, que consiste na proteína NLRP 3, proteína associada à apoptose (ASC) e a pró-caspase-1 (Hoque e Mehal, 2015). Existem muitas evidências da ação do inflamossoma NLRP3 na pancreatite. Diminuição da produção de ácidos graxos livres, cuja capacidade de ativar NLRP 3 já é conhecida, por meio do uso de um bloqueador de lipase, o Orlistat, atenuou lesão decorrente da pancreatite (Navina *et al.*, 2011). Os efetores do inflamossoma NLRP 3, que consistem em IL-1 β , IL-18, e HMGB1, por sua vez são os principais determinantes da inflamação pancreática, lesão de células do parênquima e resolução da doença, seja nas formas aguda ou crônica (Norman, J. *et al.*, 1995; Rau *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2006; Pini *et al.*, 2010). Contudo, até o presente momento, ainda não foi demonstrado a influência desse inflamossoma na nocicepção, sobretudo no recente modelo de pancreatite que utiliza etanol e ácidos graxos.

2. JUSTIFICATIVAS

A PA é uma condição de elevada incidência, incapacitante, e com evolução potencialmente fatal. Afeta aproximadamente 50/100.000 indivíduos por ano (Pandol *et al.*, 2007), tendo o consumo de álcool como um dos principais fatores etiológicos, com tendência de crescimento sendo vista nos últimos anos (Criddle, 2015).

Entre os sintomas mais referidos pelos acometidos estão os quadros dolorosos. A dor visceral, associada aos distúrbios inflamatórios gastrintestinais, é causada por disfunções de vísceras abdominais e responsável pela busca de serviços de saúde, com uma taxa de incidência anual de 15 para cada 1000 pessoas (Kraychete e Guimaraes, 2003).

Essa modalidade de dor atualmente tem despertado grande interesse de pesquisadores e clínicos devido ao reconhecimento de sua magnitude e impacto, já que a maioria dos indivíduos, em algum momento da vida, experimenta essas sensações. Ainda que a maior parte dos distúrbios com dor viscerais não sejam fatais, eles contribuem significativamente para um grande consumo de recursos no segmento da saúde e considerável impacto negativo, com sofrimento psicológico e perturbação do sono. Há ainda muitas lacunas sobre a fisiopatologia desse fenômeno (Sikandar e Dickenson, 2012).

Não há tratamento específico para os pacientes com PA, nem tampouco para a modulação da dor. O tratamento disponível baseia-se nos conhecimentos acerca da dor somática, cujos mecanismos diferenciam-se da visceral. Os opióides são utilizados nos quadros de dor severa, muito embora ajam dúvidas com respeito à sua eficácia clínica e segurança (Basurto Ona *et al.*, 2013). Há ainda um grupo de pacientes irresponsivos às medicações disponíveis, que requer a utilização de procedimentos invasivos para alívio da dor (Barreto e Saccone, 2012)

O ATP é reconhecido por ser uma molécula importante desempenhando funções fisiológicas no pâncreas (Burnstock, 2004). Sua ação envolvendo a participação dos receptores purinérgicos e a ativação do inflamossoma NLRP 3 já vem sendo demonstrada em várias doenças inflamatórias e neuropáticas, abrindo caminhos promissores para estudos envolvendo a dor visceral na PA (Burnstock, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações nociceptivas em um modelo experimental de pancreatite aguda alcoólica, investigando a participação dos receptores purinérgicos e do inflamossoma NLRP 3.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil inflamatório da pancreatite aguda alcoólica experimental no que se refere às alterações histopatológicas, bioquímicas, de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios;
- Investigar a cinética temporal das alterações nociceptivas no curso da pancreatite aguda alcoólica experimental;
- Avaliar o envolvimento de células residentes nas alterações nociceptivas da pancreatite aguda alcoólica experimental;
- Investigar a participação dos receptores P2X nas alterações nociceptivas da pancreatite aguda alcoólica experimental;
- Investigar o envolvimento de componentes do inflamossoma NLRP 3 nas alterações nociceptivas da pancreatite aguda alcoólica experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Nos protocolos com animais *Knockout*, foram usados como controles animais selvagens C57BL, machos, pesando de 20-25g, provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram usados animais *knockout* para componentes do Inflamossoma NLRP 3, dentre estes: NLRP 3, Caspase-1, ASC, IL1R e IL-18.

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura ambiente, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12h, recebendo ração padrão e água “*ad libitum*”. Os animais ficaram acomodados pelo menos 7 dias antes dos protocolos experimentais na sala experimental para adaptação. Os protocolos experimentais desenvolvidos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal Nacionais (COBEA, 1994). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

Para a realização dos experimentos envolvendo camundongos *Swiss*, a pesquisa foi, previamente à sua execução, submetida à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado de acordo com o protocolo nº 94/2013 (anexo). O mesmo procedimento foi adotado para a utilização dos camundongos C57BL e *Knockout*, contudo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, obtendo-se a aprovação de acordo com o protocolo nº 182/2016 (anexo).

4.2. INDUÇÃO DA PANCREATITE ALCOÓLICA

Pancreatite aguda experimental foi induzida através da administração de ácido palmitoléico (POA) (150 mg/Kg) combinado ao etanol (1,35 g/Kg), ambos obtidos na Sigma Aldrich, EUA, na proporção 4:6, por via intraperitoneal, duas

vezes com um intervalo de 1h. Os controles receberam etanol ou salina (Huang *et al.*, 2014).

4. 2. 1. Protocolo Experimental para a Caracterização das Alterações Inflamatórias na Pancreatite Alcoólica

Para avaliação do estado geral dos animais realizou-se pesagem diária dos mesmos e registro dos óbitos para avaliar a sobrevivência no referido modelo no decorrer de 96h.

Nos tempos de 6h, 24h e 48h grupos de animais foram eutanasiados, sendo retirados os pâncreas para análise histopatológica e mensuração da atividade de mieloperoxidase (MPO), e plasma, para a mensuração dos níveis séricos de amilase e lipase. No tempo de 24h, realizaram-se mensuração de citocinas pró-inflamatórias no pâncreas (IL-1 β , MCP-1, TNF- α e IL-6) e de marcadores de estresse oxidativo, sendo o nível de GSH (glutathiona) mensurado no pâncreas, e de MDA (malonildialdeído), no plasma.

a) Análise histopatológica do pâncreas

O pâncreas foi embebido em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5 μ m por meio de um micrótomo e, posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE). As alterações morfológicas características de pancreatite avaliadas foram edema, infiltração inflamatória e necrose. O grau de edema foi determinado utilizando uma escala de 0 a 3 (0= ausente, 1 = edema interlobular, 2= edema interlobular e moderado edema intralobular, e 3 = edema interlobular e severo edema intralobular). A presença de infiltrado inflamatório também foi analisada, obedecendo a uma grade de 0 a 3 (0= ausente 1= infiltração perivascular escassa, 2= moderada infiltração perivascular e escassa infiltração difusa, e 3 = abundante infiltração difusa). A necrose do parênquima foi analisada pela atribuição de escores de 0 a 3 (0= ausente, 1= menos do que 15% de células pancreáticas envolvidas, 2= de 15 a 35% das células pancreáticas envolvidas, e 3= mais do que 35% de células envolvidas) (Wildi *et al.*, 2007).

b) Dosagem de lipase e amilase séricas

A determinação da amilase e lipase séricas foram feitas através de testes colorimétricos (Labtest e Bioclin, Brasil, respectivamente), onde foram seguidas as instruções do fabricante.

c) Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Amostras de pâncreas foram coletadas, pesadas e maceradas em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Aldrich, EUA), pH 6,0, na proporção de 500 μ L de solução para 50 mg de tecido. Posteriormente, o macerado foi centrifugado (5000 rpm, 7 min, 4°C). Em seguida, 10 μ L do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços em duplicata. Em cada poço, adicionaram-se 200 μ L de solução contendo O-dianisidina (Sigma Aldrich, EUA), 5 mg diluída em 3 mL tampão fosfato. A essa solução foram ainda adicionados 15 μ L de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Sigma Aldrich, EUA) a 1%. Determinou-se a absorbância em leitor de absorbância (BMG Labtech, Espanha) no comprimento de onda de 450 nm. Foi realizada leitura no tempo zero e após 1 minuto. Os resultados foram expressos em unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO será definida como a quantidade capaz de converter 1 μ mol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C (Bradley *et al.*, 1982).

d) Dosagem do malonildialdeído (MDA)

Para a dosagem de MDA, será utilizado o método do Tbars adaptado (Lee *et al.*, 2012). A mistura de 50 μ L de soro com 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma Aldrich, EUA) ficará em banho-maria por 30min a 37°C. Em seguida será adicionado 200 μ L do ácido tiobarbitúrico (0,6%) nos tubos e esta solução permanecerá em banho-maria por mais 50min a 100°C. Como padrão será utilizada o 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TMP, Sigma Aldrich, EUA). O sobrenadante será

mensurado em espectrofotômetro (BMG Labtech, Espanha) na faixa de 535 nm. Os dados foram expressos em μM .

e) Dosagem de glutationa (GSH)

Amostras com 100 mg de pâncreas foram trituradas com um homogeneizador de tecidos em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Sigma Aldrich, EUA) a 0,02 M (1mL). Em seguida, foi transferido o volume de 400 μL da solução para um tubo, no qual foi adicionada água destilada (320 μL) e 80 μL de ácido tri-cloro-acético (TCA, Sigma Aldrich, EUA) 50%. A mistura foi centrifugada (3000 rpm, 15 min, 4°C). Foram retirados 400 μL de sobrenadante e transferidos para outro tubo. A esse sobrenadante foi adicionado 800 μL de tampão-Tris (0,4 M, pH 8,9) e a 20 μL ácido 5,5-ditiolbis (2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma Aldrich, EUA) diluído em metanol (Vetec, Brasil, 0,01M). A mistura foi agitada por 3 min e a leitura realizada em espectrofotômetro (BMG Labtech, Espanha) a 412 nm. Os dados foram expressos em μg de GSH/ g de tecido (Owens e Belcher, 1965).

f) Dosagem de Citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1)

Os níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1) no tecido pancreático foram mensurados, utilizando um sistema de ensaio de citocinas multiplex Bioplex (Bio-rad, EUA), que permite quantificar múltiplos biomarcadores em um único poço, em uma placa de 96 poços.

Resumidamente, 50 μL das *beads* foram colocadas nos poços da placa, a placa foi lavada em lavadora apropriada com 100 μL de tampão de lavagem. Em seguida 50 μL padrão, das amostras e do “branco” foram colocados na placa, que é incubada no escuro, durante uma hora à 300 rotações por minuto (rpm). Adiciona-se 25 μL do anticorpo de detecção e a placa é incubada novamente a 300 rpm, por 30 min. Mais uma lavagem foi realizada e, finalmente, 50 μL de estreptavidina-PE é adicionado em cada poço e após 10 minutos de incubação e lavagem, as *beads*

serão novamente suspensas em 125µL de tampão de ensaio e incubadas a 1100 rpm por 30 segundos.

Logo em seguida foi realizada a leitura da placa à 635 e 532 nm através do sistema Bio-Plex (Bio-rad, EUA). Os dados serão analisados utilizando o Bio-Plex Software Manager (versão 3.0, Bio-Rad, EUA) e expressos em pg/mg de proteínas.

4. 2. 2. Protocolo Experimental para a Caracterização da Hiperálgia Mecânica Visceral na Pancreatite Alcoólica

Para avaliação as alterações nociceptivas viscerais na pancreatite alcoólica utilizou-se o teste de hiperálgia mecânica abdominal (Von Frey), sendo o mesmo realizado nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h. Como a resposta mensurada nesse teste trata-se de uma atividade motora, realizou-se o teste de Rota Rod para avaliar o efeito do etanol sobre esse parâmetro.

Realizou-se ainda a análise da expressão de c-FOS na medula espinhal torácica após 24h da indução da pancreatite.

a) Teste de Rota Rod

O aparelho de Rota Rod (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) é constituído por uma barra de 36 mm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos que giram à velocidade de 22 rotações por min. Cada animal foi submetido a um pré-teste 24 h antes dos experimentos, sendo eliminados os animais que não permaneceram sobre o aparelho por, pelo menos, dois períodos consecutivos de 60 s cada (Dunham e Miya, 1957).

Foi mensurado o tempo de latência (em s), que consiste no tempo de permanência no equipamento em cada um dos grupos experimentais após a indução da pancreatite aguda.

b) Teste de Hiperalgisia Mecânica Visceral Abdominal

A hiperalgisia visceral foi mensurada através da avaliação da resposta a um estímulo mecânico abdominal através de um analgesímetro digital (Insight Equipamentos Científicos, Brasil), que é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável 0,5 mm² que estimula diretamente o abdômen do animal (Winston *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2013).

Para início do experimento, os animais tiveram sua região abdominal depilada e as áreas determinadas para estimulação receberam marcação com uma linha que atravessa o esterno até uma região a meio caminho entre as pernas dianteiras e traseiras. Aos animais foram postos nas cabines de observação 15 min antes da realização do teste para a aclimatação.

O experimentador, cego à divisão dos grupos e tratamentos, aplicou a ponteira em ângulo reto na região demarcada do abdômen do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque resposta de retirada. Foram consideradas respostas de retirada: retração do abdômen, lambida ou contração abdominal imediatamente após a aplicação da ponteira e salto (Laird *et al.*, 2001). O estímulo é então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica fica registrada no aparelho.

Foram realizadas três aplicações distintas para cada animal, antes (basal) e em variados tempos após a indução da pancreatite. Foi calculada a média das três aplicações, determinando-se o limiar nociceptivo (força, em g). Quanto menor o limiar nociceptivo, mais sensibilidade é observada.

c) Avaliação da expressão de c-FOS na medula por *Western Blotting*

Amostras de medula espinhal torácica (T8-T12) foram maceradas em solução tampão de PBS com anti-proteases e mensurada a quantidade de proteínas por meio do kit BCA (Sigma Aldrich, EUA) em placa de 96 poços, com leitura em espectrofotômetro (BMG Labtech, Espanha) em absorbância de 570 nm.

Foi padronizada a quantidade de 100 µg/µl de proteínas. Em seguida, foi realizada a separação eletroforética (Biorad mini-gel) das amostras após

desnaturação (por meio de ebulição) em gel de poliacrilamida 7% (SDS-*Page*), com marcador de proteínas (Invitrogen). O gel foi então transferido para uma membrana de PVDF em aparelho de voltagem máxima e 450 mA (Biorad mini-transfercell) durante 3h30 min a 4°C. Após, a membrana de celulose foi bloqueada com BSA 5% (Sigma Aldrich, EUA) por 1 hora, a fim de bloquear outras proteases, seguida de incubação com anticorpo primário (anti-c-FOS, Santa Cruz, EUA) *over night*, diluição 1:500 em BSA 5%. Após lavagens com tampão, foi feita incubação com anticorpo secundário (anti-goat, Santa Cruz, EUA), diluído 1:2500 em BSA 5%, durante 1 hora, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana pela técnica de *ECL*, em aparelho FujiLab (LAS3000), com posterior leitura e o diagnóstico da densidade das bandas (Multi Gauge V3.0).

4. 2. 3. Investigação do Papel de Macrófagos Peritoneais na Hiperálgia Visceral na Pancreatite Alcoólica.

Com o intuito de investigar o papel de células residentes na nocicepção visceral decorrente da pancreatite alcoólica, realizamos a remoção destas por lavagem da cavidade peritoneal (Souza *et al.*, 1988).

Animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg), via intraperitoneal, e três cateteres sob agulha (24G, BD Biosciences, EUA) foram inseridos na cavidade abdominal. Foi injetada solução salina 10 mL através de um primeiro catéter inserido nas proximidades do esterno. A cavidade abdominal foi suavemente massageada por 1 minuto, e o fluido peritoneal foi recolhido por outras duas agulhas inseridas na região inguinal. Esse procedimento foi repetido três vezes. Fluido peritoneal derivado da primeira e da última lavagem foram coletados para contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer após coloração com Turk e, contagem diferencial, após coloração com HE. Esse procedimento foi necessário para avaliar a eficácia da depleção (Assreuy *et al.*, 2002). Animais controle (Sham) foram submetidos à inserção das três agulhas e manipulados de forma semelhante, mas nenhum líquido foi injetado ou retirado.

Trinta minutos após completa recuperação anestésica, foi induzida pancreatite alcoólica, mediante protocolo já explicitado anteriormente. Foi realizado teste de hiperálgia mecânica abdominal na 24h após a indução da pancreatite.

4.6. Investigação do Papel dos Masticates na Hiperalgisia Visceral na Pancreatite Alcoólica.

Com o propósito de depletar mastócitos da cavidade peritoneal e verificar a influência dessa célula residente na hiperalgisia visceral decorrente da pancreatite alcoólica, os animais foram submetidos a um pré-tratamento com composto 48/80, um degranulador de mastócitos.

As doses administradas foram crescentes, administradas a cada 12h, e seguiram o esquema: 1º dia, 0,6 mg/Kg; 2º dia, 1 mg/Kg; 3º dia, 1,2 mg/Kg e 4º dia, 2,4 mg/Kg (Ribeiro *et al.*, 1991). A PA foi induzida 24h após a última injeção do composto 48/80 e realizado teste de hiperalgisia mecânica abdominal na 24h após indução da pancreatite.

Para confirmar a depleção, foi, ainda, realizada a contagem total de leucócitos no fluido peritoneal em câmara de Neubauer através da adição de corante de Turk e, diferencial, para determinação do número mastócitos, após coloração com HE (Assreuy *et al.*, 2002).

4.7. Modulação da Hiperalgisia Visceral Decorate da Pancreatite Gaud pesos Receptores Purinérgicos

Foram utilizados dois antagonistas de receptores purinérgicos: um não seletivo para receptores do tipo P2, o ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfonato (PPADS, Sigma Aldrich, EUA), e o Azul Brilhante G (BBG, Sigma Aldrich, EUA), antagonista seletivo do receptor P2X7.

As doses para o PPADS utilizadas foram de 12,5 mg/Kg e 25 mg/kg e de BBG foram de 25 mg/Kg, 50 mg/Kg e 100 mg/Kg, ambos por via intravenosa, 30 min antes da análise da nocicepção e 24h após a indução da pancreatite (Martucci *et al.*, 2008; He *et al.*, 2012; Apolloni *et al.*, 2014).

Para investigar o potencial efeito central do BBG, avaliou-se a hiperalgisia após a administração de 5 µL de uma solução 1µM/µL de BBG por via intratecal, 30 min antes da 24h após a indução da pancreatite (Ying *et al.*, 2014). Teste de Rota

Rod foi realizado para verificar efeitos depressores centrais que pudessem estar interferindo com o resultado obtido no teste de Von Frey.

4.8. Modulação da Hiperálgia Visceral na Pancreatite Alcoólica com Uso de Animais Geneticamente Modificados para Componentes do Inflamossoma NLRP 3

Antes de proceder à análise dos componentes do inflamossoma NLRP 3 em animais geneticamente modificados, realizou-se a análise temporal da hiperálgia visceral nos animais selvagens C57BL, para observar se havia homologia com o *Swiss*.

Posteriormente, para investigar o papel de componentes do inflamossoma NLRP 3, animais C57BL selvagens, foram tratados com etanol associado ao POA, sendo o controle salina e comparados com *Knockout* para NLRP 3, Caspase-1, ASC, IL1R e IL-18, subdivididos em grupos em que foi realizado o mesmo protocolo citado anteriormente, de indução da pancreatite.

Em seguida, foi avaliada a hiperálgia mecânica abdominal de todos os animais nos tempos de 24h e 48h.

4.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (Erro Padrão da Média), para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal.

A análise estatística entre os grupos realizou-se empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, baseando-se na continuidade das variáveis em análise, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$, sendo o n mínimo de 6 e máximo de 10. Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o Software GraphPad Prism®, versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Pancreatite Alcoólica Resulta em Perda de Peso e Alterações na Curva de Mortalidade

Observou-se que houve variação significativa de peso sendo que no tratamento utilizando apenas etanol essa variação só foi significativa na 24h e 48h (com redução média de 1,1% e 2,2% do peso inicial), quando comparados ao grupo salina. Já nos animais que receberam etanol + POA houve persistência dessa diferença até o último tempo avaliado, 96h. As reduções encontradas com relação ao peso inicial foram: 24h de 4,0%, 48h de 4,4%, 72h de 5,4% e 96h de 4,0% (Figura 8, A).

Os dados da curva de sobrevivência demonstram que há casos letais no modelo, sendo estes vistos em maior proporção no grupo etanol + POA quando comparado ao grupo etanol. O percentual de sobrevivência do etanol em 96h foi de 88,9% ao passo que, quando combinado ao POA, este valor é reduzido para 64,7% (Figura 8, B).

5.2. Pancreatite Alcoólica Induz Aumento de Enzimas Pancreáticas e de Parâmetros Inflamatórios

Com o propósito de caracterizar a pancreatite alcoólica, avaliou-se o nível sérico de amilase e lipase, as alterações histopatológicas e a atividade de MPO nos tempos de 6, 24 e 48h.

Com relação ao nível sérico de amilase (Figura 9), há elevação desta enzima a partir da 6h (etanol + POA: $8196,0 \pm 909,5$ U/dL *versus* salina: $4596,0 \pm 174,8$ U/dL), mantendo-se alta até a 24h para o grupo etanol + POA (etanol + POA: $6443,0 \pm 306,3$ U/dL *versus* salina: $1860,0 \pm 230,8$ U/dL). Houve diferença estatística apenas na 24h para o etanol isolado (etanol: $5246,0 \pm 206,3$ U/dL *versus* salina: $1860,0 \pm 230,8$ U/dL). No tempo de 48h essa enzima não mostra mais diferenças significativas entre os grupos avaliados.

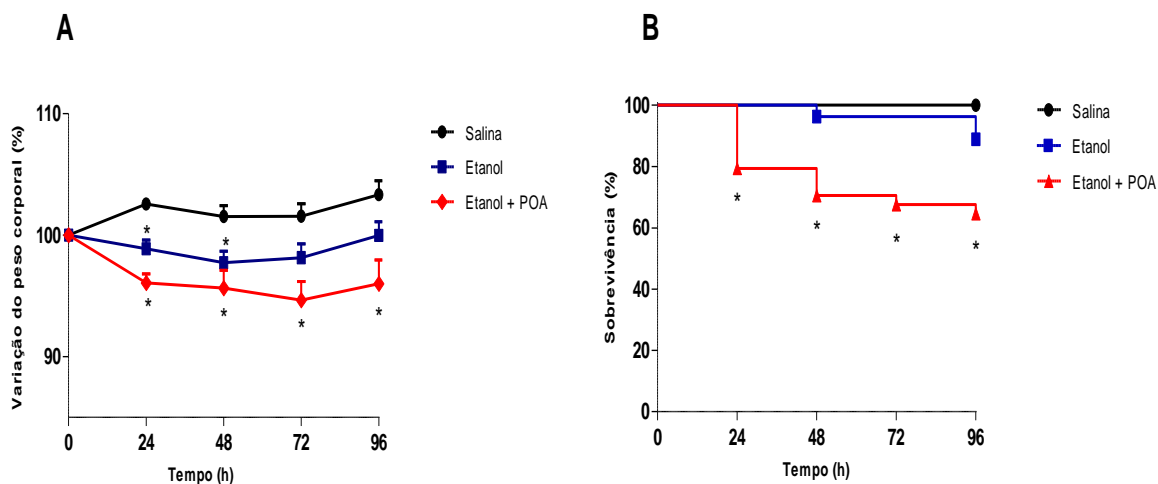


Figura 8. Pancreatite alcoólica resulta em perda de peso (A) e alteração da curva de mortalidade (B). ANOVA seguido por teste de Bonferroni para análise da variação de peso e teste de Mantel-Cox para análise da curva de sobrevivência, n de 6 a 10, * p<0,05 quando comparado com salina.

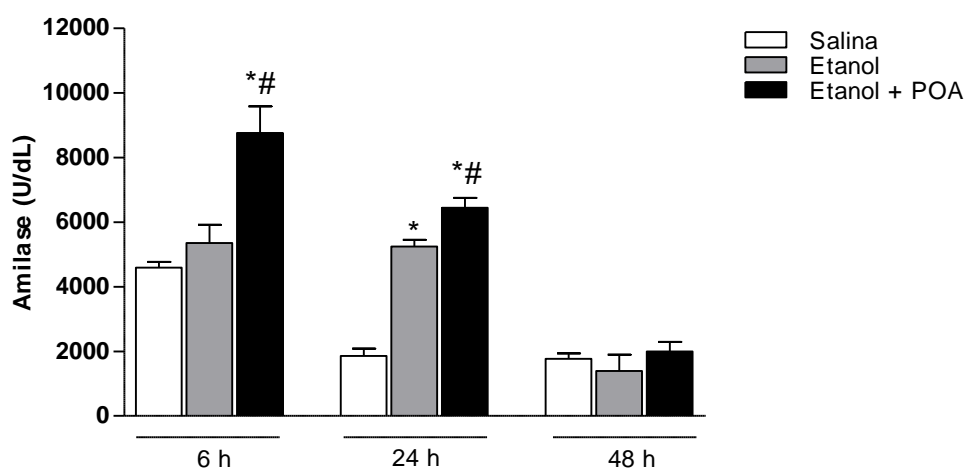


Figura 9. Pancreatite alcoólica induz aumento de amilase sérica. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 10, p <0,05, * quando comparado com salina e #, com etanol.

Já a lipase (Figura 10), eleva-se mais tardiamente, quando comparada à amilase, iniciando a diferença significativa a partir de 24h (etanol + POA: 272,8 \pm 4,1

U/dL *versus* salina: $235,7 \pm 8,4$ U/dL) e persistindo até 48h para o etanol + POA (etanol + POA: $356,8 \pm 10,4$ U/dL *versus* salina: $297,9 \pm 12,1$ U/dL). O uso do etanol isolado não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tempos avaliados.

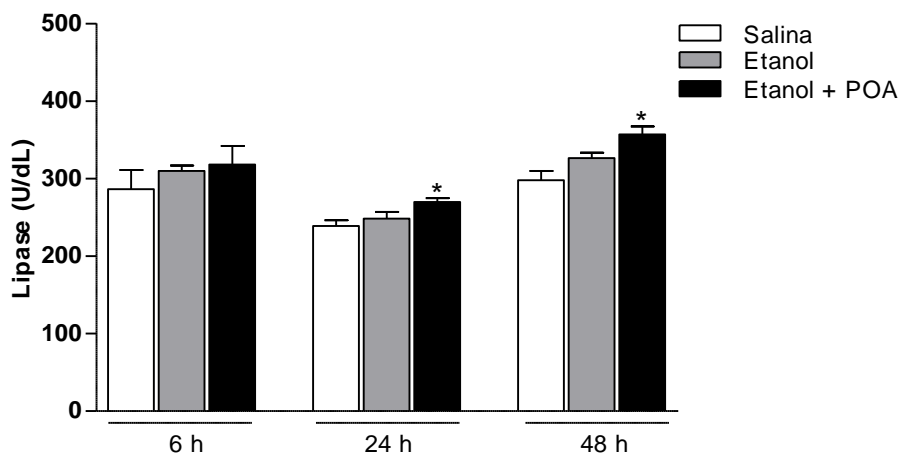


Figura 10. Pancreatite alcoólica induz aumento de lipase sérica. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 10, * $p < 0.05$ quando comparado com salina.

A análise histopatológica do pâncreas foi realizada e, nesta, foram avaliados os seguintes parâmetros: edema, infiltrado de células inflamatórias, necrose e escores totais, que consiste no somatório dos escores anteriores. Esse resultado mostrou que o grupo etanol + POA apresenta significativas mudanças em todos os parâmetros e tempos, quando comparado com o grupo salina. Já o grupo etanol apenas apresentou alterações significativas no tempo de 24h, quando comparado ao grupo salina, não havendo, nesse tempo diferença quando comparado com grupo etanol + POA (Figura 11 e 12).

Somando-se ao resultado anterior, foi investigada a atividade de MPO nos três grupos experimentais (etanol + POA, etanol e salina) nos tempos de 6h, 24h e 48h (Figura 12). O etanol + POA promoveu aumento da atividade dessa enzima em 24h (etanol + POA: $22,4 \pm 1,8$ UMPO/mg de tecido *versus* salina: $3,3 \pm 0,6$ UMPO/mg de tecido) e 48h quando comparado à salina (etanol + POA: $8,5 \pm 1,4$ UMPO/mg de tecido *versus* salina: $1,8 \pm 0,4$ UMPO/mg de tecido), contudo o etanol

apenas apresentou diferença estatística apenas em 24h (etanol: $12,8 \pm 1,7$ UMPO/mg de tecido *versus* salina: $3,3 \pm 0,6$ UMPO/mg de tecido).

O tempo de 24h apresenta maiores valores de atividade de MPO quando comparado com o tempo de 48h para o grupo etanol + POA (24h: $22,4 \pm 1,8$ UMPO/mg de tecido *versus* 48h: $8,5 \pm 1,4$ UMPO/mg de tecido), portanto, foi escolhido o tempo de 24h para análise de citocinas e de marcadores de estresse oxidativo que estão a seguir.

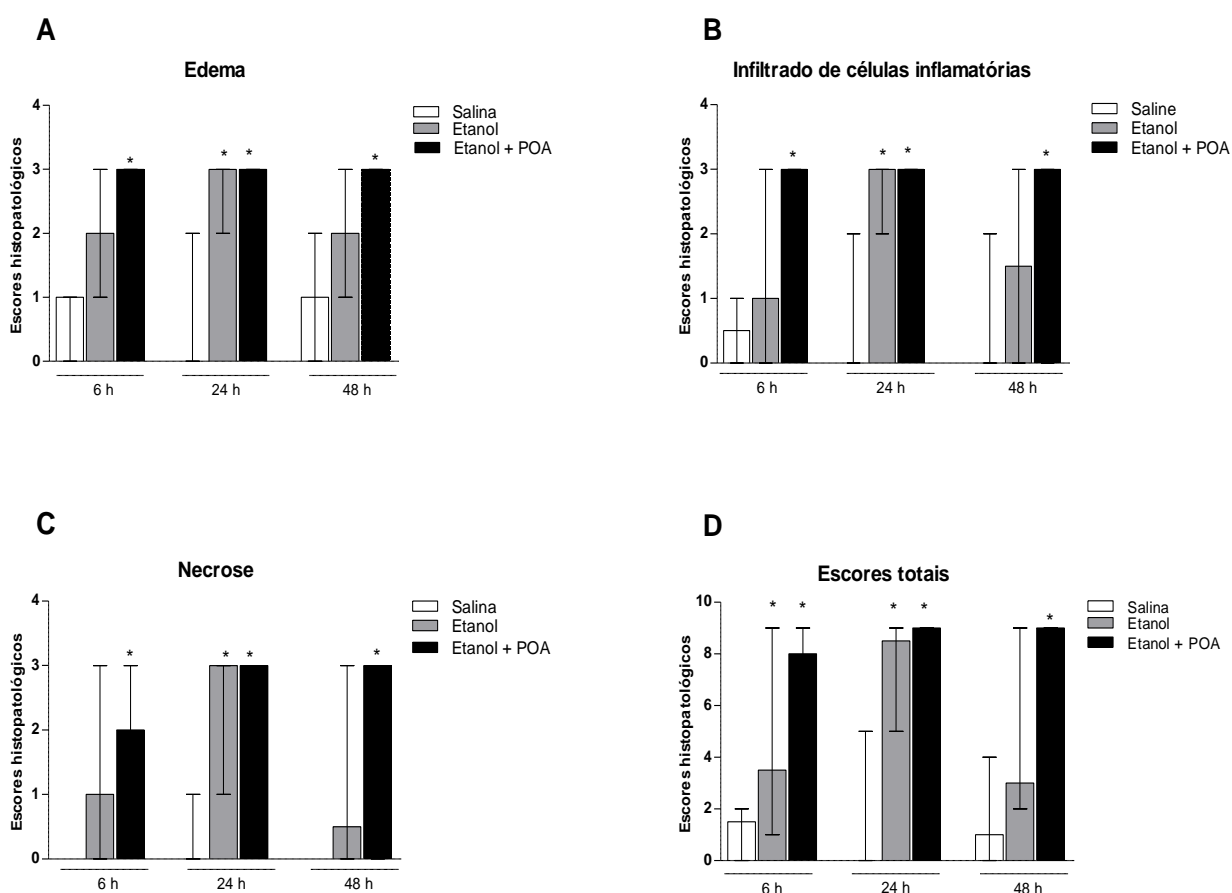
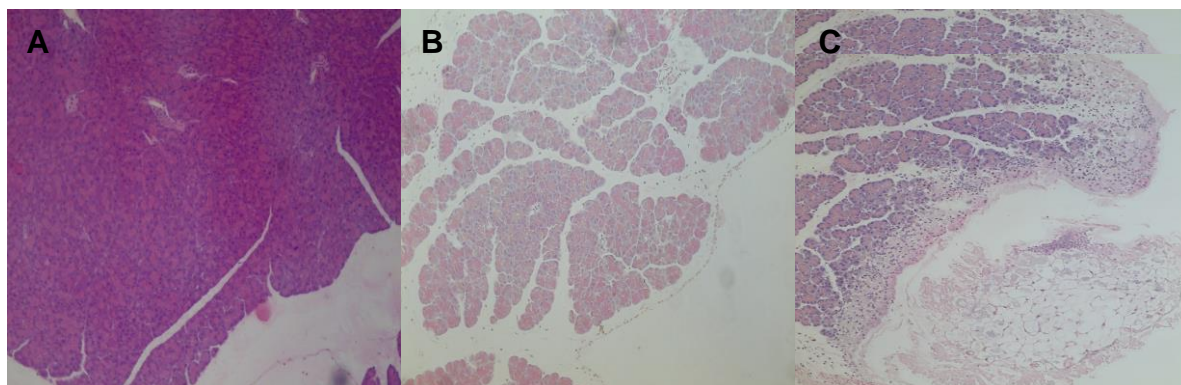
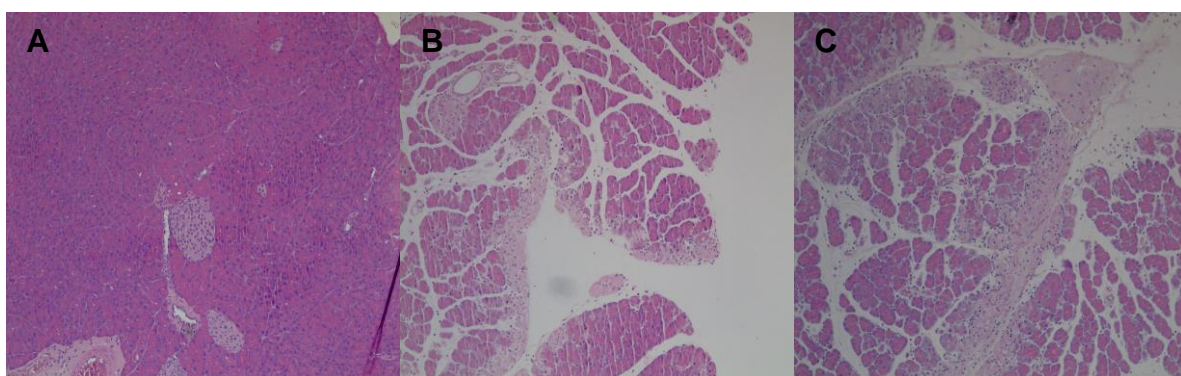


Figura 11. Pancreatite alcoólica induz alterações histopatológicas no pâncreas. Os parâmetros avaliados foram (A) edema, (B) infiltrado de células inflamatórias, (C) necrose e (D) escores totais, resultante do somatório de todos os escores anteriores. Dados expressos com mediana \pm máximo/mínimo. Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste Dunn, n de 6 a 10, * p < 0.05 quando comparado com salina.

6h



24h



48h

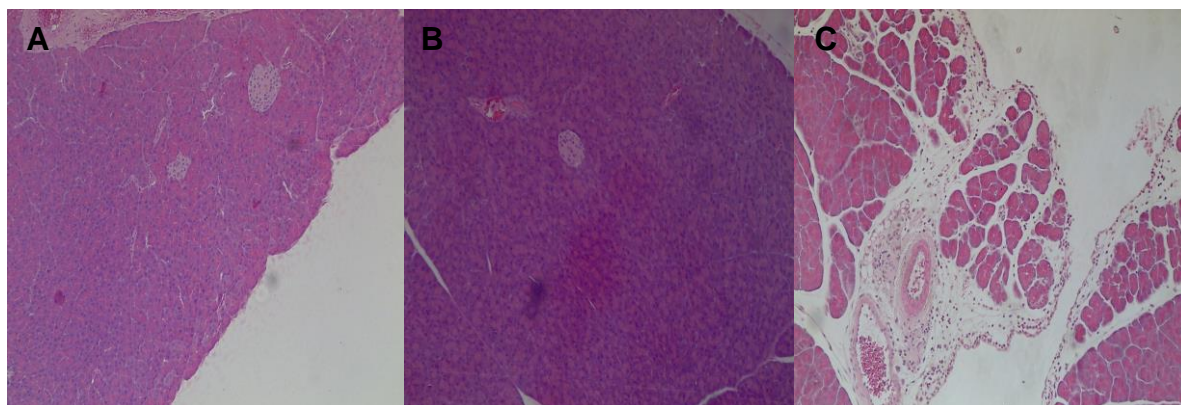


Figura 12. Imagens representativas das alterações histopatológicas na pancreatite alcoólica. Imagens representativas. A) Salina, B) Etanol e C) Etanol + POA para cada tempo analisado. Coloração HE, aumento 10x.

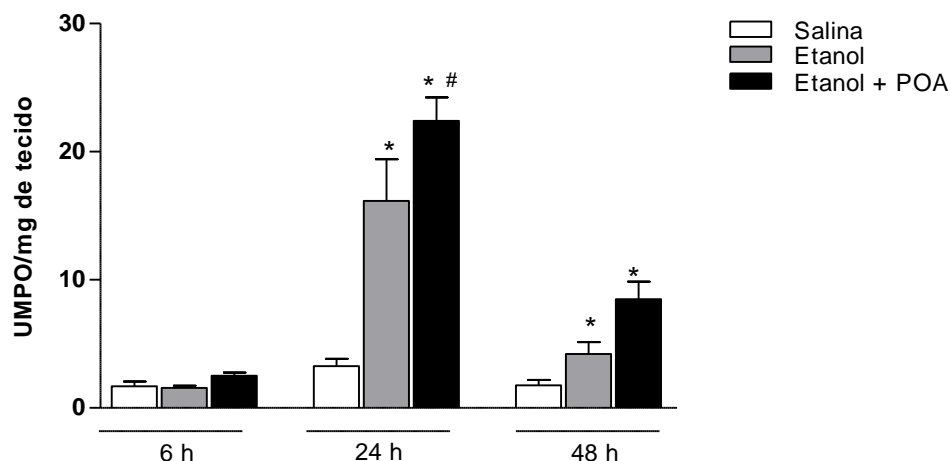


Figura 13. Pancreatite alcoólica induz aumento da atividade de MPO no pâncreas. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, * $p < 0.05$ quando comparado com salina, #, com etanol.

5.3. Pancreatite Alcoólica Induz Alterações no Nível de Citocinas Pró-Inflamatórias Pancreáticas

Para uma melhor caracterização do perfil inflamatório, analisou-se o nível pancreático de quatro citocinas: IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MCP-1 (Figura 14), todas de natureza pró-inflamatória, 24h após a indução da PA. O etanol isolado não foi capaz de causar aumento significativo em nenhuma das citocinas avaliadas nesse tempo quando comparadas com controle salina, contudo há forte tendência de aumento do nível de TNF- α . Já a associação etanol + POA causou significativo aumento dos níveis de IL-1 β e MCP-1, quando comparadas com controle salina (IL-1 β : etanol + POA: $13,0 \pm 3,6$ pg/mg de tecido *versus* salina: $3,9 \pm 0,4$ pg/mg de tecido e MCP -1: etanol + POA: $237,8 \pm 114,5$ pg/mg de tecido *versus* salina: $41,5 \pm 7,7$ pg/mg de tecido). Apesar de ter sido encontrado nível mais elevado de IL-6 no grupo etanol + POA, não houve diferença estatística quando o mesmo foi comparado com os grupos salina e etanol.

5.4. Pancreatite Alcoólica Induz Alterações no Nível de Marcadores de Estresse Oxidativo

Foram avaliados os níveis de GSH pancreático e de MDA sérico, marcadores de estresse oxidativo na 24h após indução da pancreatite. A associação etanol + POA cursa com depleção dos níveis de GSH pancreático (etanol + POA: $14,3 \pm 1,73$ GSH/mg de tecido *versus* salina: $31,9 \pm 2,23$ GSH/mg de tecido) e com aumento dos níveis de MDA sérico (etanol/POA: $5,12 \pm 0,32$ μ M *versus* salina: $2,75 \pm 0,29$ μ M), ambos os fenômenos relacionados ao aumento do estresse oxidativo. O etanol isoladamente causou apenas depleção de GSH pancreático (etanol: $17,02 \pm 1,76$ GSH/g de tecido *versus* $31,90 \pm 2,23$ GSH/g de tecido), não afetando, no tempo estudado, os níveis séricos de MDA para o tempo analisado (Figura 15).

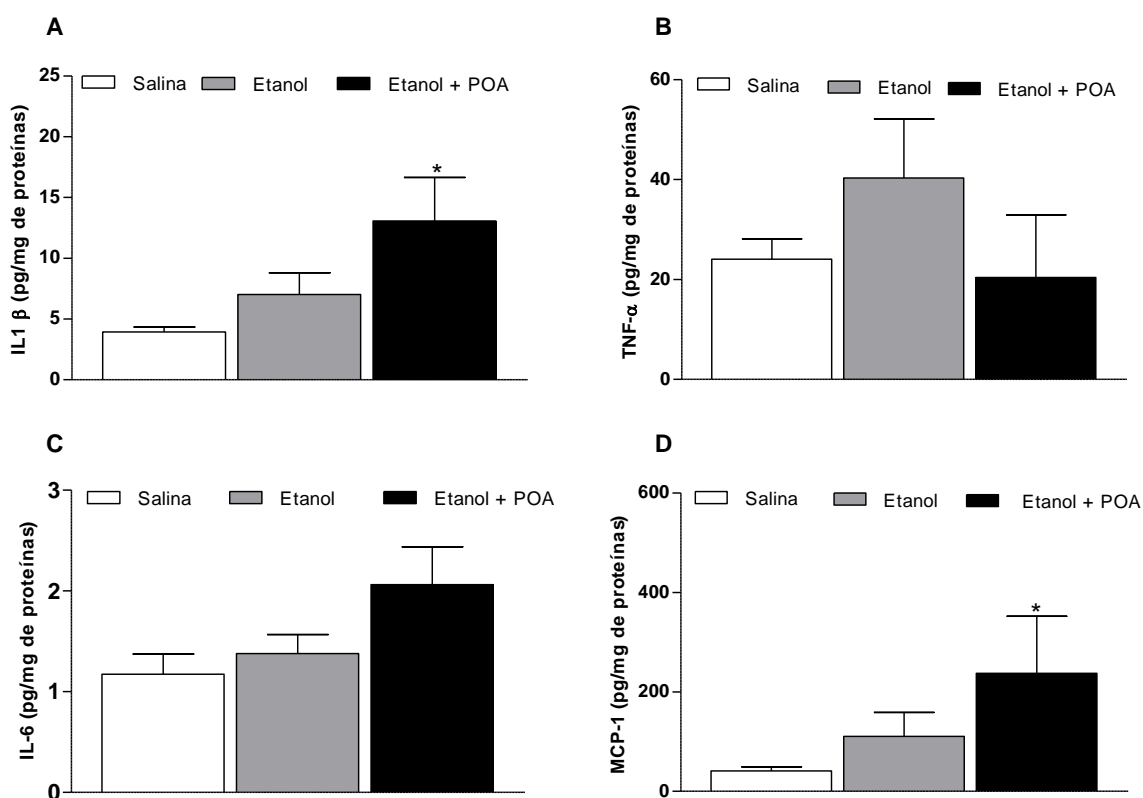


Figura 14. Pancreatite alcoólica induz alteração no nível de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas avaliadas foram (A) IL 1 β , (B) TNF- α , (C) IL-6 e (D) MCP-1. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 5, * p < 0.05 quando comparado com salina.

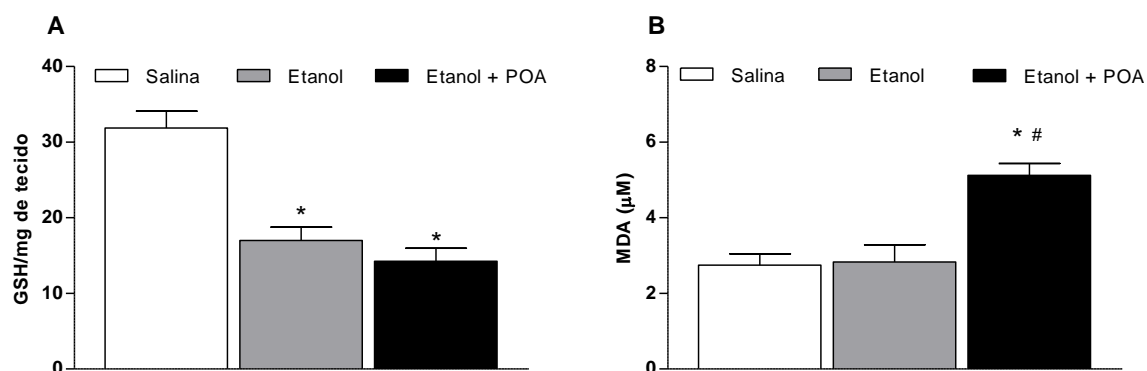


Figura 15. Pancreatite alcoólica induz alteração no nível de marcadores de estresse oxidativo. Nível de GSH pancreático (A) e de MDA sérico (B). Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0,05$, * quando comparado com salina, # com etanol.

5.5. Pancreatite Alcoólica Causa Hiperalgisia Visceral

Como a avaliação da hiperalgisia visceral depende de uma reação a um estímulo mecânico, com um comportamento que envolve movimentação e ativação motora, antes do mesmo foi realizado o teste de Rota Rod. Por meio deste foi possível constatar o tempo que o etanol e a associação do mesmo com POA influenciam na atividade locomotora, o que inviabilizaria a avaliação da nocicepção.

Foi observado que tanto a aplicação de etanol isolado quanto combinado ao POA foi capaz de alterar a atividade locomotora dos animais, sendo este fenômeno visto na 1ª h (salina: $112,6 \pm 3,1$ s, etanol: $34,0 \pm 5,7$ s e etanol + POA: $11,2 \pm 3,3$ s) e na 2ª h após a aplicação (salina: $109,4 \pm 6,8$ s, etanol: $70 \pm 10,9$ s e etanol + POA: $34,4 \pm 6,9$ s), sendo apenas na 2ª h verificada diferença estatística entre o etanol isolado comparado ao associado com POA. Na 3ª h já não foi verificada diferença estatística sobre esse teste (Figura 16). Definimos, portanto, que seria válida a avaliação da hiperalgisia a partir da 3h. Optamos por realizar uma curva de nocicepção na seguinte sequência temporal: nas primeiras 24h a cada 6h, posteriormente a cada 24h até que não fosse verificada mais diferença estatística entre os grupos.

Os dados obtidos com a avaliação da hiperalgesia no abdômen demonstram que o modelo de pancreatite alcoólica utilizado cursa com importantes alterações nociceptivas, havendo diferença entre o efeito encontrado da aplicação do etanol isolado e combinado ao POA a partir da 12^a h até a 72^a h (12h- salina: $16,3 \pm 0,8$ g, etanol: $8,8 \pm 0,6$ g e etanol + POA: $3,9 \pm 0,4$ g e 72h - salina: $15,9 \pm 1,1$ g, etanol: $12,6 \pm 1,2$ g e etanol + POA: $5,5 \pm 1,0$ g). No tempo de 6^a h foram encontradas alterações nociceptivas sem diferenças estatísticas entre etanol comparado ao etanol + POA, no entanto havendo diferença quando estes são comparados com o grupo salina (salina: $15,4 \pm 1,3$ g, etanol: $9,4 \pm 0,6$ g e etanol + POA: $6,5 \pm 0,8$ g). No tempo de 96h não se detectou diferenças entre os grupos (Figura 16). Não foi encontrada diferenças nos limiares nociceptivos no tempo basal, antes da aplicação dos estímulos (salina: $16,2 \pm 0,7$ g, etanol: $15,2 \pm 0,9$ g e etanol + POA: $14,6 \pm 1,0$ g).

5.6. Pancreatite Alcoólica Causa Alteração na Expressão de c-FOS na Medula Espinhal

Foi realizada avaliação da expressão de c-FOS, marcador da ativação neuronal, na medula torácica dos camundongos no tempo de 24 h para confirmarmos os dados comportamentais obtidos. Assim como visto no teste de hiperalgesia, houve diferença entre os grupos tratados com etanol isolado e etanol + POA quando comparados ao grupo salina, e, ainda, quando comparados entre si (Figura 17). O grupo etanol aumentou 2,47x e o grupo etanol + POA 4,09 em relação ao salina.

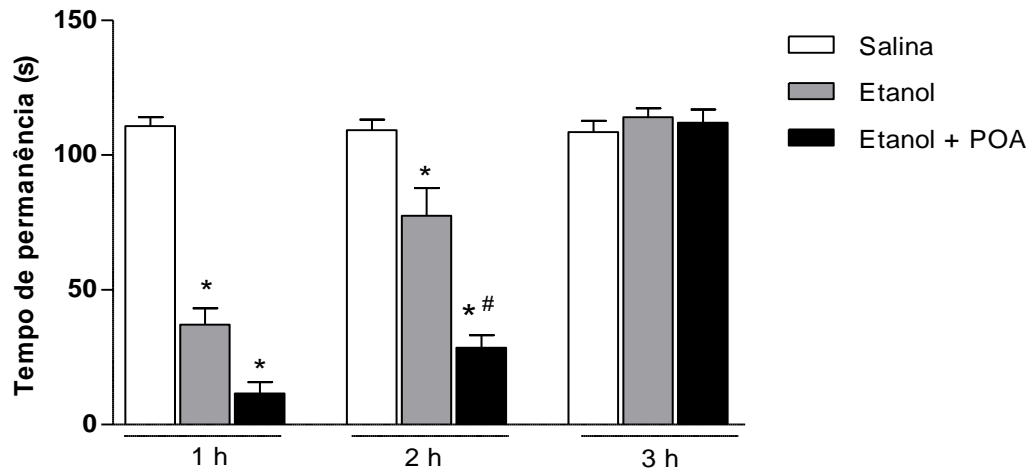
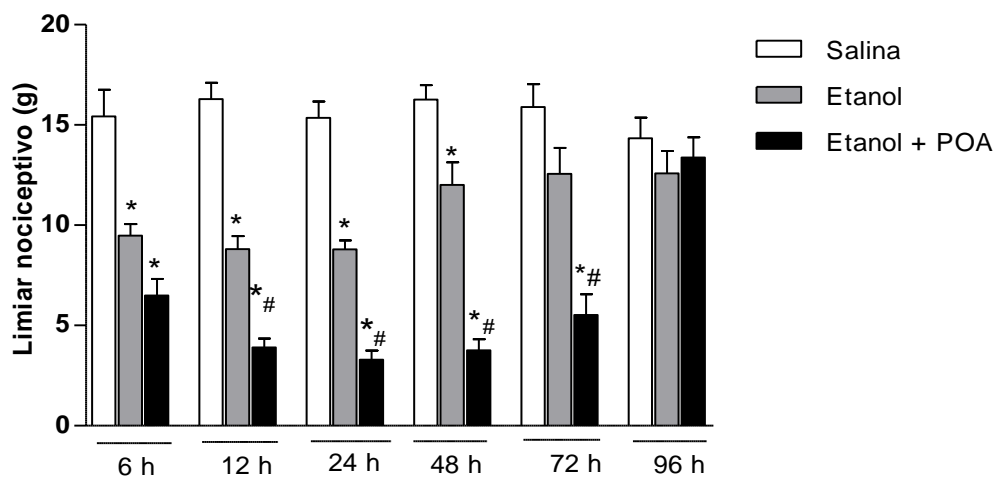
A**B**

Figura 16. Pancreatite alcoólica cursa com hiperalgesia mecânica abdominal. (A) Teste de Rota Rod e (B) Teste de Von Frey. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol.

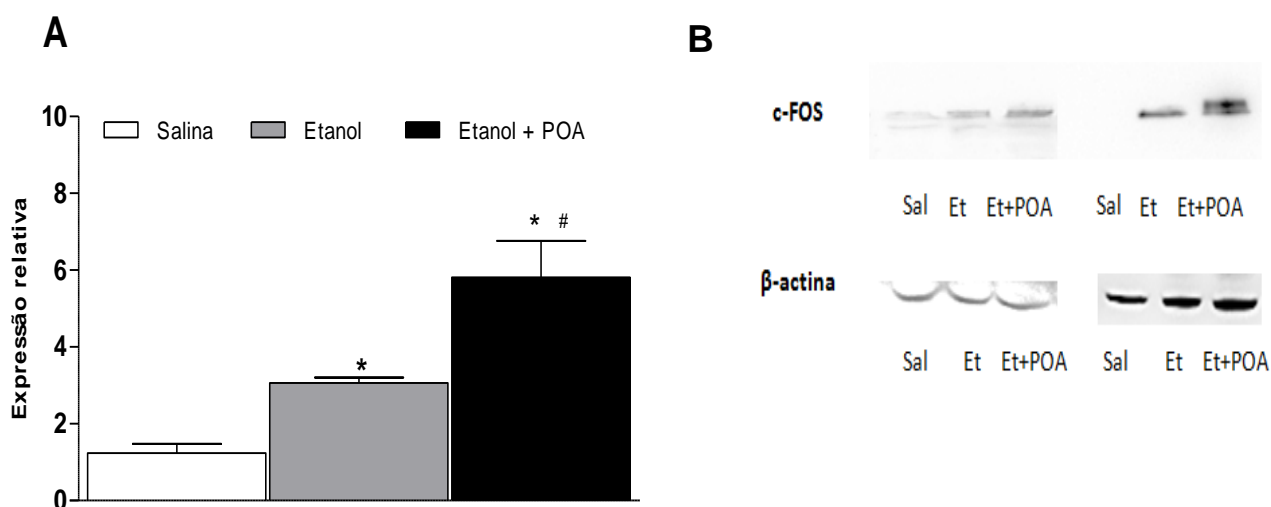


Figura 17. Pancreatite alcoólica causa alteração na expressão de c-FOS medular. (A) Gráfico com a expressão relativa média. Proteína-padrão β -actina e (B) Imagem representativa dos géis obtidos. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 5, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol.

5.5. Células Residentes Estão Envolvidas nas Alterações Nociceptivas da Pancreatite Alcoólica

No propósito de avaliar a participação de células residentes na fisiopatologia da hiperalgesia induzida pela pancreatite alcoólica, foi realizado um protocolo experimental de lavagem peritoneal, com remoção destas células. Posteriormente, foi induzida PA nos animais depletados e não depletados e realizado teste de hiperalgesia abdominal 24h após a última injeção dos agentes inflamatórios.

O protocolo utilizado foi efetivo na redução de células residentes, tendo em vista que a lavagem reduziu em torno de 98% na contagem total de leucócitos (Figura 18, A), sendo visto ainda, que estas são predominantemente macrófagos, em torno de 92%.

Essa depleção de células residentes alterou limiares nociceptivos (Figura 18, B) vistos nos grupos etanol e etanol + POA, que tornaram mais elevados, quando comparados com os análogos que não receberam as lavagens (etanol: $7,4 \pm 0,7$ g *versus* etanol depletado: $11,9 \pm 0,6$ g; etanol + POA: $2,9 \pm 0,4$ *versus* etanol + POA

depletado: $7,7 \pm 0,7$ g). Contudo, o grupo etanol + POA depletado não voltou aos limiares basais, persistindo diferença quando comparado com seus limiares antes da indução da PA (etanol + POA depletado 24h: $7,7 \pm 0,7$ g *versus* etanol + POA basal: $16,0 \pm 0,6$ g). Antes de realizar quaisquer procedimentos (tempo basal) não foram encontradas diferenças entre os grupos (Salina: $14,0 \pm 0,8$ g, Salina dp: $14,6 \pm 0,8$, Etanol: $15,4 \pm 0,8$ g, Etanol dp: $14,7 \pm 1,0$ g, Etanol: $13,2 \pm 0,4$ g, Etanol + POA dp: $15,6 \pm 0,9$ g).

Na tentativa de elucidar se o mastócito poderia também estar envolvido na gênese dessas alterações nociceptivas, foi utilizado um protocolo de depleção de mastócitos por meio de um clássico degranulador de mastócitos, o composto 48/80. Grupos de animais depletados e não depletados foram subdivididos e, a pancreatite induzida por meio de duas injeções intraperitoneais de etanol ou etanol + POA, sendo o controle salina. Von Frey foi avaliado 24h após a última injeção dos estímulos indutores da pancreatite.

A depleção de mastócitos causou aumentos dos limiares nociceptivos quando comparados com grupos de animais não depletados (Figura 19, B), tanto para o etanol (etanol: $8,72 \pm 0,5$ g *versus* etanol depletado: $14,7 \pm 1,7$ g) quanto para etanol + POA (etanol + POA: $3,11 \pm 0,3$ g *versus* etanol + POA depletado: $8,5 \pm 0,65$ g), demonstrando a participação dessas células. Os mastócitos foram contados, havendo redução significativa dos mesmos, demonstrando a eficácia do método de depleção (Figura 19, A). Antes da depleção (basal) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Salina: $15,6 \pm 0,6$ g, Salina dp: $15,2 \pm 0,5$ g, Etanol: $17,3 \pm 1,1$ g, Etanol dp: $14,3 \pm 0,3$ g, Etanol: $14,8 \pm 0,9$ g, Etanol + POA dp: $17,3 \pm 1,0$ g).

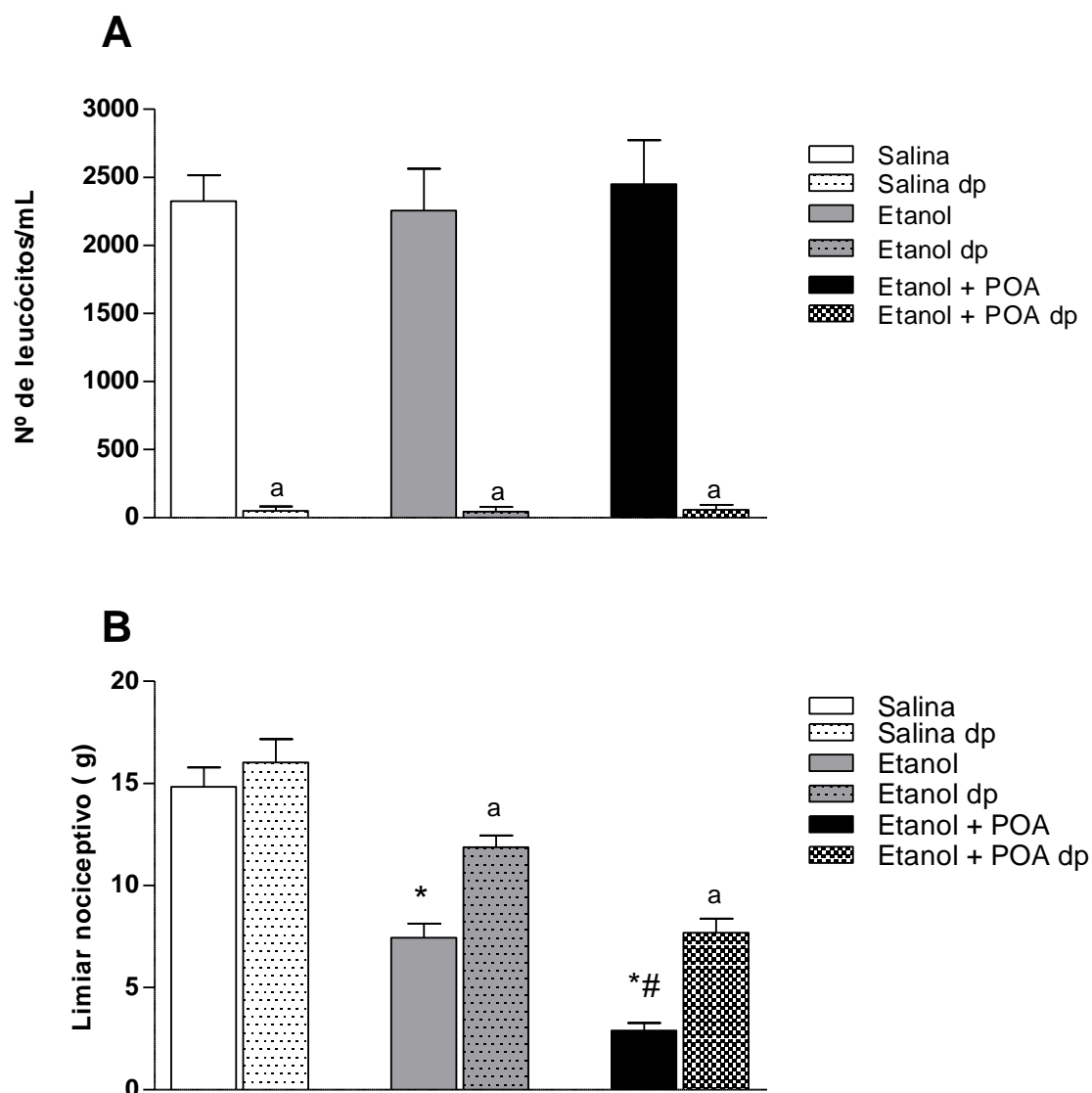


Figura 18. Macrófagos participam da hiperalgesia na pancreatite alcoólica. (A) Contagem total de leucócitos durante o procedimento de depleção (dp). A primeira barra em cada grupo se refere à contagem de células obtida no fluido da primeira lavagem e a segunda barra, se refere ao obtido na última. Os animais não depletados passaram pelo procedimento, contudo sem infusão ou coleta de fluido (B) Teste de Hiperálgesia Mecânica Abdominal realizado 24h após a indução da pancreatite alcoólica. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol e "a" com análogo não depletado.

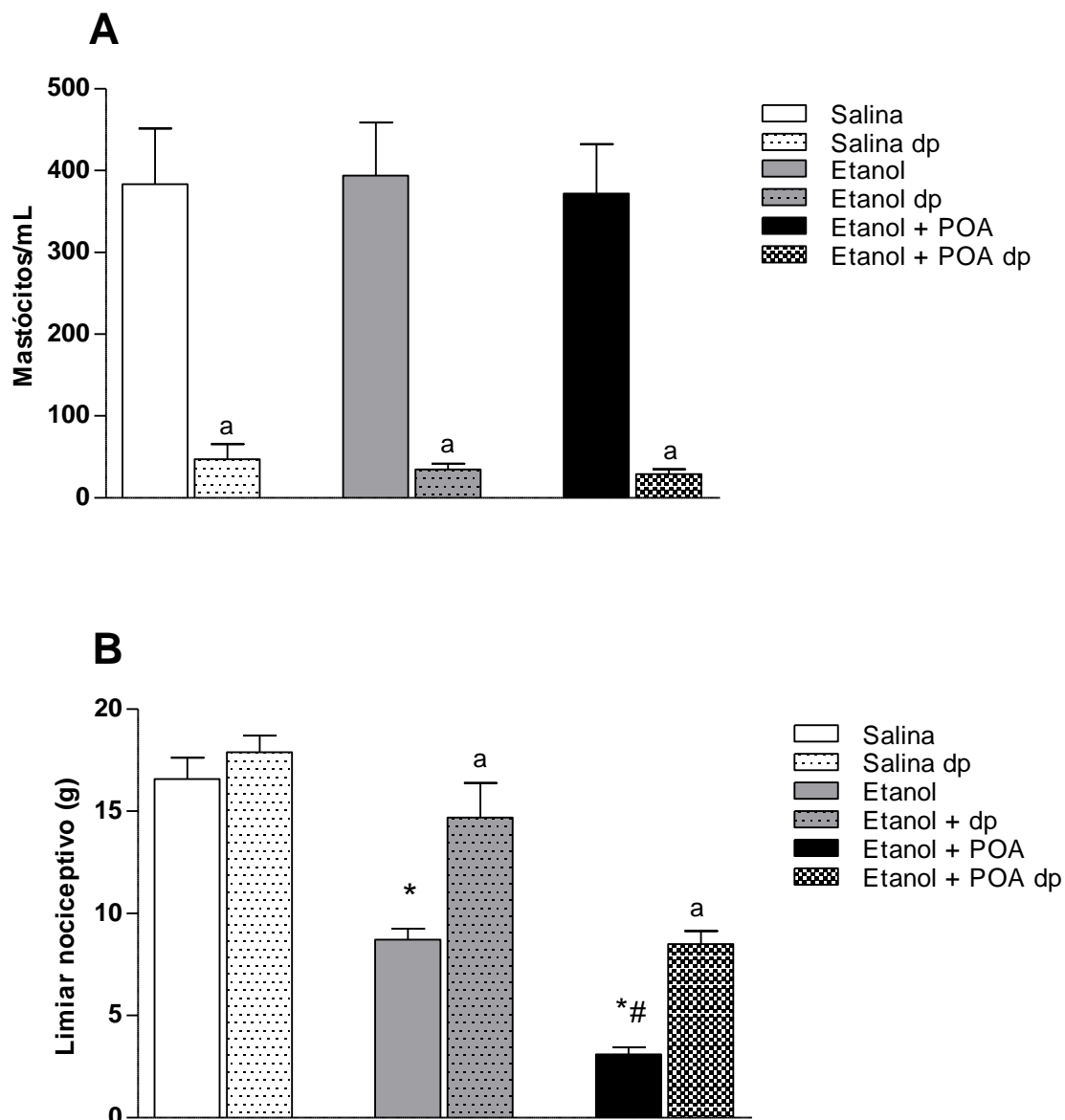


Figura 19. Mastócitos participam da hiperalgesia na pancreatite alcoólica. (A) Contagem de mastócitos (B) Teste de Hiperalgesia Mecânica Abdominal realizado 24h após a indução da pancreatite alcoólica. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol e “a” com análogo não depletado.

Como a literatura aponta que as células residentes podem participar de vias nociceptivas mediante ação em receptores purinérgicos, sobretudo P2X (Hoque *et al.*, 2011), buscamos explorar a modulação desses receptores nos resultados seguintes.

5.6. Nociceção na Pancreatite Alcoólica é Modulada por Antagonistas Purinérgicos

Para avaliar o efeito dos receptores purinérgicos sobre a pancreatite alcoólica foram utilizados dois antagonistas: o PPADs, antagonista P2 inespecífico e, o BBG, antagonista seletivo P2X7.

O PPADs nas doses de 12,5 mg/Kg e 25 mg/Kg foi capaz de aumentar os limiares nociceptivos tanto para o etanol quanto para o etanol + POA (12,5 mg/Kg: etanol= $8,0 \pm 0,86$ g *versus* etanol+PPADS: $14,0 \pm 2,7$ g; etanol + POA = $4,4 \pm 0,4$ g *versus* etanol + POA + PPADS = $9,3 \pm 2,3$ g; 25 mg/Kg: etanol= $8,0 \pm 0,86$ g *versus* etanol+PPADS: $11,9 \pm 0,7$ g; etanol+POA = $4,4 \pm 0,4$ g *versus* etanol+POA + PPADS = $10,4 \pm 0,8$ g) (Figura 20, A). Não houve diferenças entre os grupos nos limiares basais (salina: $15,38 \pm 0,48$ g, etanol: $14,85 \pm 0,45$ g, etanol + POA: $13,68 \pm 0,44$ g).

Já o BBG, apresentou efeito somente nas doses de 50 mg/Kg (etanol: $7,98 \pm 0,40$ *versus* etanol + BBG: $13,16 \pm 0,76$ g; etanol+POA: $3,35 \pm 0,49$ g *versus* etanol+POA + BBG: $8,14 \pm 0,50$ g) e 100 mg/Kg (etanol: $7,98 \pm 0,40$ *versus* etanol + BBG: $15,35 \pm 1,37$ g; etanol+POA: $3,35 \pm 0,49$ g *versus* etanol/POA + BBG: $10,38 \pm 1,17$ g), tanto para o etanol quanto para o etanol+POA. Não há diferenças de efeito entre essas doses. A dose de 25 mg/Kg não foi efetiva nem para nenhum estímulo (Figura 20, B). Não houve diferenças entre os grupos nos limiares basais (salina: $16,18 \pm 0,42$ g, etanol: $15,04 \pm 0,95$ g, etanol + POA: $16,7 \pm 0,40$ g).

Os dados demonstram a importância da ação do receptor P2X7, já que o efeito do bloqueador não-seletivo é mantido com o uso de um seletivo para esse subtipo. Aprofundamos a investigação com esse subtipo, para investigar se o bloqueio do mesmo produzia algum efeito protetor na PA. Para tal, fizemos a análise histopatológica do pâncreas com o uso do bloqueador na dose de 50 mg/Kg, via intravenosa.

Observou-se que o efeito antinociceptivo do BBG não se associa a um efeito anti-inflamatório, tendo em vista que não houve mudanças nas alterações

histopatológicas induzidas pela pancreatite alcoólica mediante a administração do antagonista (Figura 21).

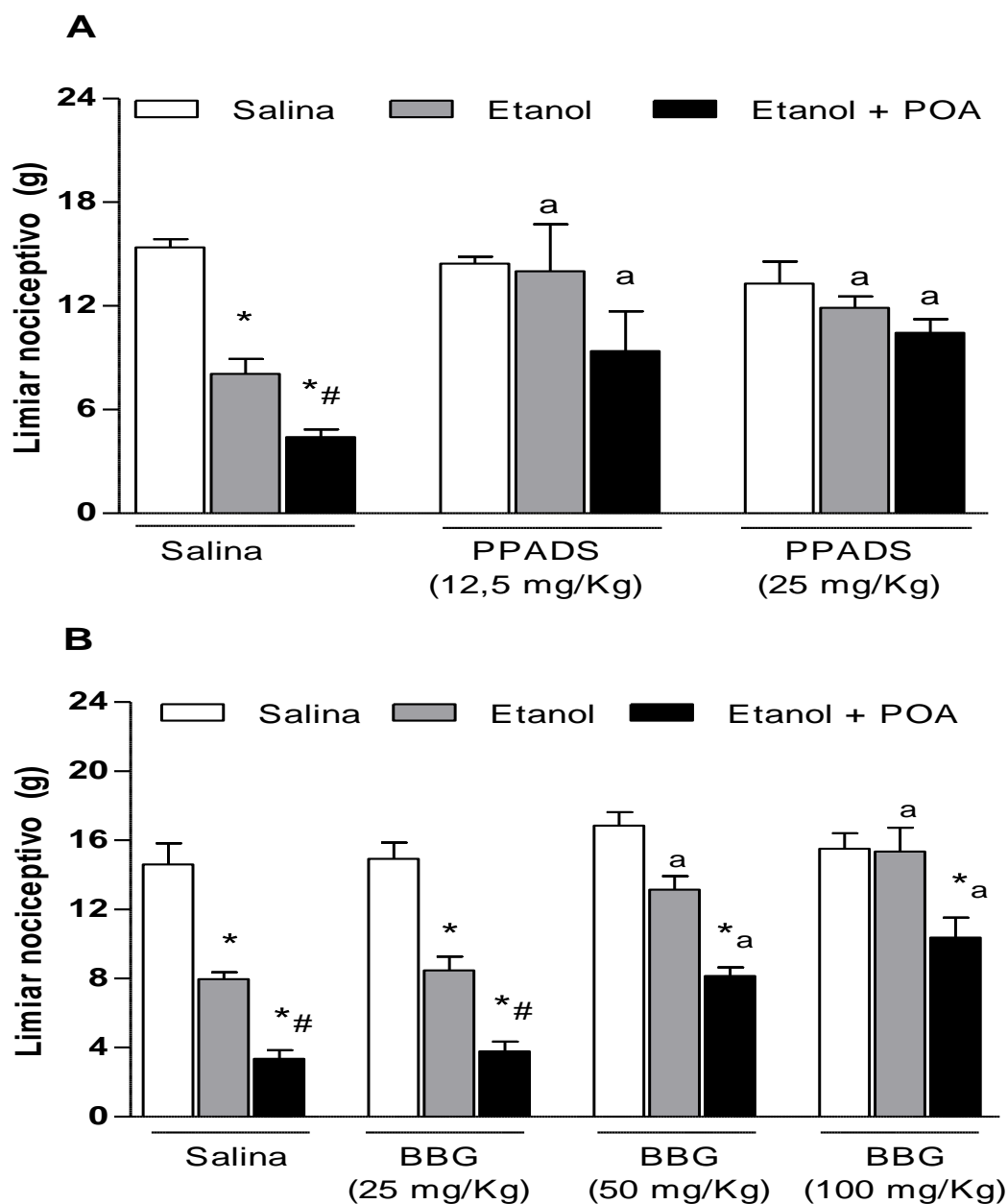


Figura 20. Hiperalgisia na pancreatite alcoólica é modulada por antagonistas purinérgicos. (A) Teste de Von Frey 24h após a indução da pancreatite alcoólica com uso do PPADS (B) Com utilização do BBG. Os antagonistas foram administrados intraperitoneal mente, 30 min antes da realização das medidas. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol e "a" com análogo sem bloqueador.

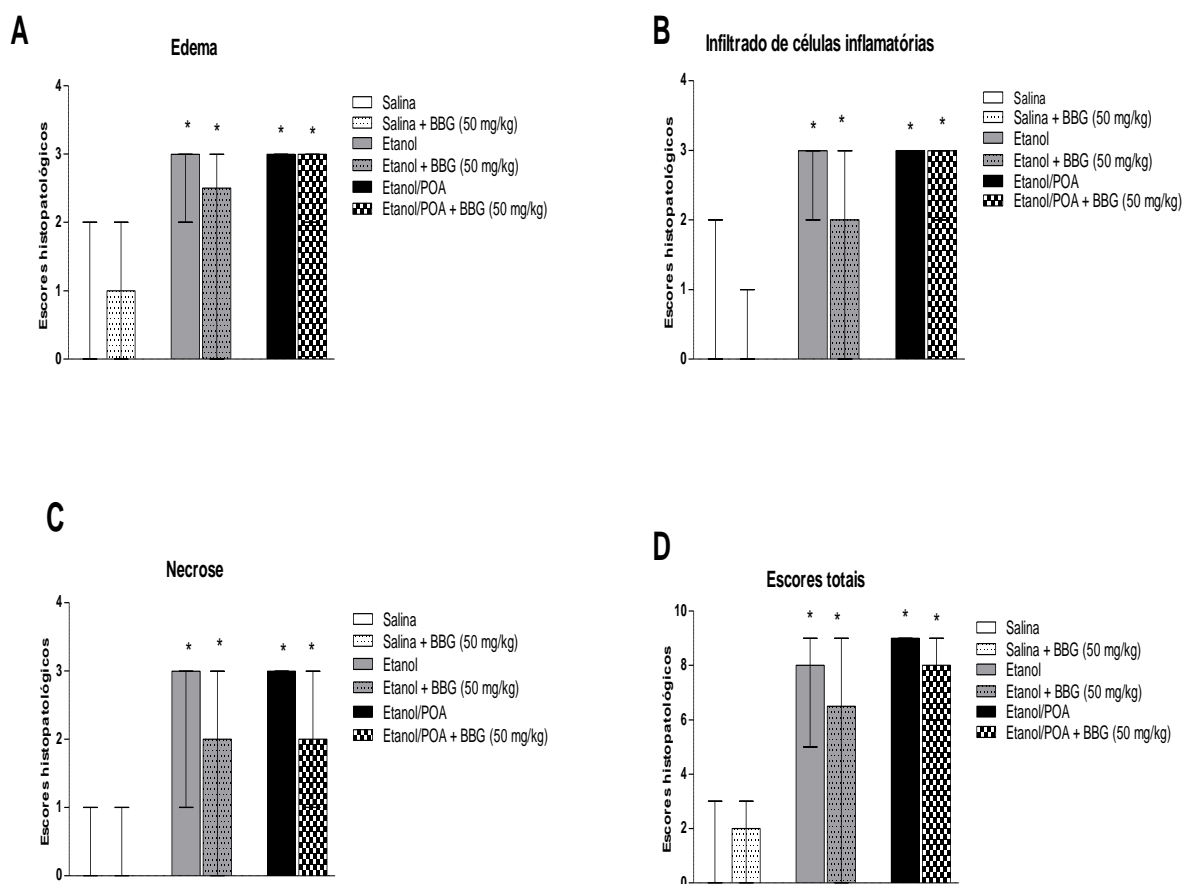


Figura 21. BBG (50 mg/Kg) não alterou as mudanças histopatológicas da pancreatite alcoólica. Os parâmetros avaliados foram (A) edema, (B) infiltrado de células inflamatórias, (C) necrose e (D) escores totais, resultante do somatório de todos os escores anteriores. Dados expressos com mediana \pm máximo/mínimo. Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste Dunn, n de 6 a 10, * p <0.05 quando comparado com salina.

Foi realizada, ainda, a administração do BBG por via intratecal, com o objetivo de elucidar se havia algum componente central no efeito desse antagonista. Paralelamente, foi realizado o teste de Rota Rod para avaliar o possível efeito dessa substância sobre o efeito locomotor.

O uso intratecal do BBG (Figura 22, A) ocasionou diminuição dos limiares nociceptivos tanto nos grupos etanol quanto etanol + POA (etanol: $6,8 \pm 1,0$ g *versus* etanol + BBG: $10,35 \pm 0,6$ g; etanol + POA: $2,4 \pm 0,1$ g *versus* etanol + POA

+ BBG: $8,47 \pm 0,9$ g). Não houve interferência da administração intratecal de BBG na dose testada sobre a atividade locomotora, visto no teste de Rota Rod (Figura 22, B). Os escores basais não mostraram diferenças significativas em nenhum dos grupos (salina: $13,66 \pm 0,44$ g, etanol: $13,91 \pm 0,57$ g, etanol + POA: $14,03 \pm 0,68$ g).

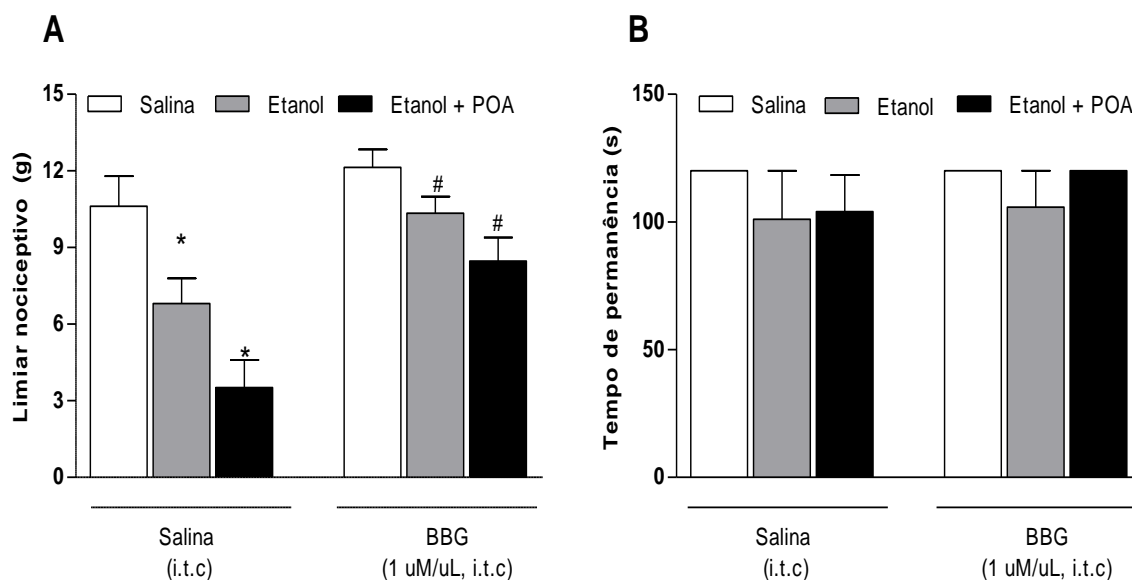


Figura 22. Hiperalgesia é modulada pela administração intratecal de BBG. A) Teste de Hiperalgesia Mecânica Abdominal e B) Teste de Rota Rod, ambos realizados 24h após a indução da pancreatite e bloqueador administrado 30 min antes da realização das medidas. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol e “a” com análogo sem bloqueador.

5.6. Nociceção na Pancreatite Alcoólica Experimental é Modulada por Delco Gênica de Componentes do Inflamossoma NLRP 3

Uma das possibilidades de ação deflagrada pelo receptor P2X7 é a ativação do inflamossoma NLRP 3. Para avaliar o efeito dessa via sobre a nociceção, os experimentos seguiram com camundongos da espécie C57BL selvagens (WT) e seus respectivos *Knockout* (KO) para componentes desse inflamossoma.

Antes disso, no entanto, foi avaliado o perfil de alterações nociceptivas presente na PA induzida por etanol e etanol + POA nos camundongos C57BL, já que as modificações gênicas foram obtidas em camundongos dessa espécie.

Observou-se que a curva de alterações nociceptivas do camundongo C57BL é muito similar a do *Swiss* (Figura 23), contudo o etanol não alterou de forma significativa os limiares nociceptivos em nenhum dos tempos avaliados. Já o etanol + POA reduziu os limiares da 6h (etanol + POA: $3,5 \pm 0,8$ g versus salina: $6,7 \pm 0,7$ g) até 72h (etanol + POA: $2,9 \pm 0,2$ g versus $6,0 \pm 0,4$ g), convergindo para o padrão de curva encontrado nos camundongos *Swiss*. Não foram encontradas diferenças entre os grupos nos limiares basais (salina: $6,96 \pm 0,52$ g, etanol: $7,32 \pm 0,73$ g, etanol + POA: $6,44 \pm 0,89$ g). O etanol isoladamente não causou alterações nociceptivas, nesse ponto diferindo do *Swiss*. Em virtude disso, trabalhou-se nos experimentos com *Knockout* (KO) apenas com os grupos etanol + POA e salina.

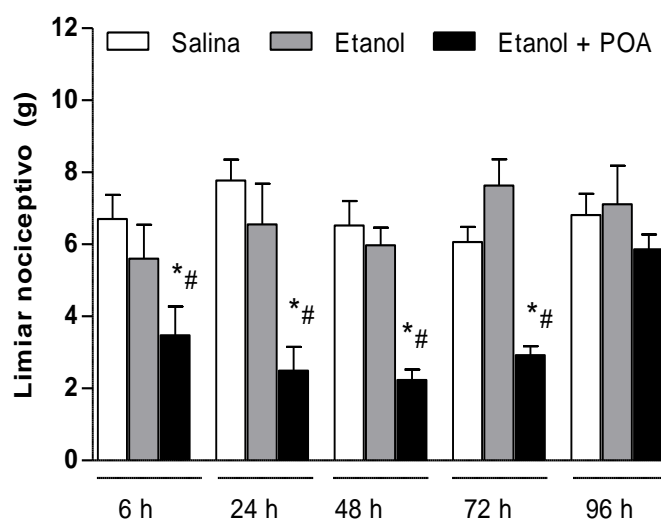


Figura 23. Curva temporal das alterações nociceptivas na pancreatite alcoólica em camundongos C57BL. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e #, com etanol.

Foram testados alguns componentes do inflamossoma NLRP 3 sobre a nocicepção na pancreatite alcoólica experimental. Usaram-se animais KO para NLRP 3, ASC, Caspase-1, IL-1R e IL-18.

O animais KO para NLRP 3 que receberam etanol + POA apresentaram aumento do seu limiar nociceptivo quando comparado com os animais WT

submetidos ao mesmo tratamento em 6h (KO NPLR 3 (-/-)) etanol + POA: $5,5 \pm 0,6$ g versus WT etanol + POA: $3,2 \pm 0,5$ g), 24h (KO NPLR 3 (-/-)) etanol + POA: $3,9 \pm 0,9$ g versus WT etanol + POA: $1,8 \pm 0,2$ g) e 48h (KO NPLR 3 (-/-)) etanol + POA: $6,0 \pm 0,7$ g versus WT etanol + POA: $2,9 \pm 0,4$ g). Não foram identificadas diferenças nos limiares basais (salina WT: $8,37 \pm 0,60$ g, etanol + POA WT: $7,77 \pm 0,38$ g, salina KO: $7,15 \pm 0,94$ g, etanol + POA KO: $8,1 \pm 0,43$ g) (Figura 24).

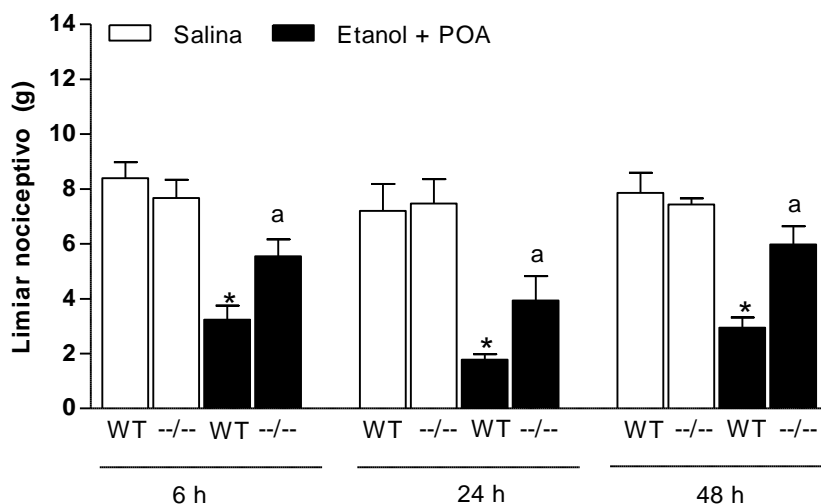


Figura 24. Deleção gênica da proteína NPLR 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica em camundongos C57BL. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0,05$, * quando comparado com salina e a, com análogo sem a deleção.

Quando foram usados animais KO para ASC, observou-se aumento no limiar nociceptivo do grupo etanol + POA KO quando comparado ao WT com mesmo tratamento nos tempos de 6h (ASC (-/-)) etanol + POA: $8,7 \pm 0,5$ g versus WT etanol + POA: $3,9 \pm 0,5$ g), 24h (ASC (-/-)) etanol + POA: $8,2 \pm 0,4$ g versus WT etanol + POA: $2,6 \pm 0,3$ g) e 48h (ASC (-/-)) etanol + POA: $5,1 \pm 0,7$ g versus WT etanol + POA: $3,8 \pm 1,0$ g). Não houve diferença estatística nos limiares basais (salina WT: $10,33 \pm 0,27$ g, etanol + POA WT: $12,20 \pm 0,56$ g, salina KO: $10,9 \pm 0,60$ g, etanol + POA KO: $11,12 \pm 0,40$ g) (Figura 25).

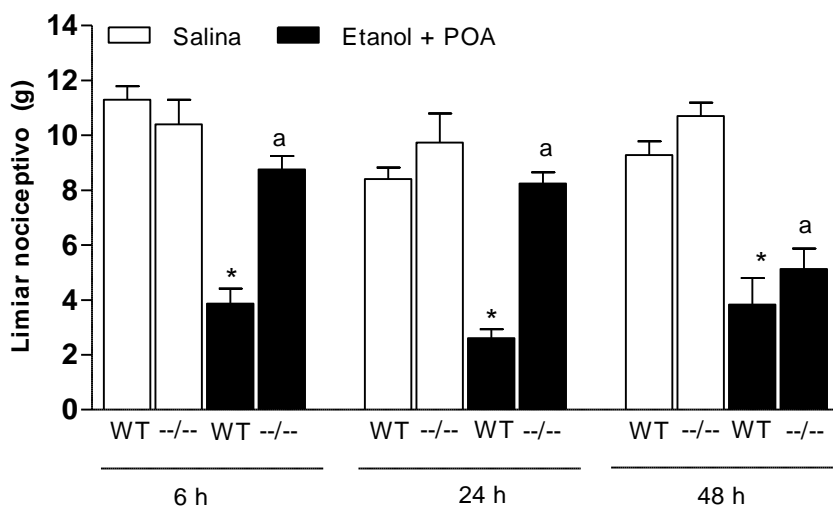


Figura 25. Deleção gênica do componente ASC do inflamossoma NPLR 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica em camundongos C57BL. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e a, com análogo sem a deleção.

Já os KO para Caspase-1 que receberam etanol + POA apresentaram aumento do seu limiar nociceptivo quando comparado com os animais WT submetidos ao mesmo tratamento nos tempos de 6h (Caspase-1 (-/-) etanol + POA: $10,2 \pm 0,7$ g versus WT etanol + POA: $3,2 \pm 0,5$ g) e 24 h (Caspase (-/-) etanol + POA: $9,1 \pm 0,7$ g versus WT etanol + POA: $1,7 \pm 0,2$ g) e 48 h (Caspase (-/-) etanol + POA: $5,4 \pm 1,0$ g versus WT etanol + POA: $2,9 \pm 0,4$ g) Não houve alterações nos limiares basais (salina WT: $8,8 \pm 0,58$ g, etanol + POA WT: $9,3 \pm 0,42$ g, salina KO: $9,7 \pm 0,44$ g, etanol + POA KO: $10,1 \pm 0,53$ g) (Figura 26).

Foi ainda avaliado o efeito do KO para IL-1R (Figura 27). Os resultados demonstram que houve elevação em todos os tempos avaliados quando comparados KO com seu análogo em tratamento WT. Foram avaliados os tempos de 6h (IL-1R (-/-) etanol + POA: $9,7 \pm 0,4$ g versus WT etanol + POA: $3,9 \pm 0,5$ g), 24h (IL-1R (-/-) etanol + POA: $9,3 \pm 0,4$ g versus WT etanol + POA: $2,6 \pm 0,3$ g) e 48h (IL-1R (-/-) etanol + POA: $8,0 \pm 0,5$ g versus WT etanol + POA: $3,8 \pm 1,0$ g). Os limiares basais não apresentaram diferenças significativas (salina WT: $11,4 \pm 0,38$ g, etanol + POA WT: $11,5 \pm 0,32$ g, salina KO: $11,9 \pm 0,64$ g, etanol + POA KO: $10,9 \pm 0,73$ g).

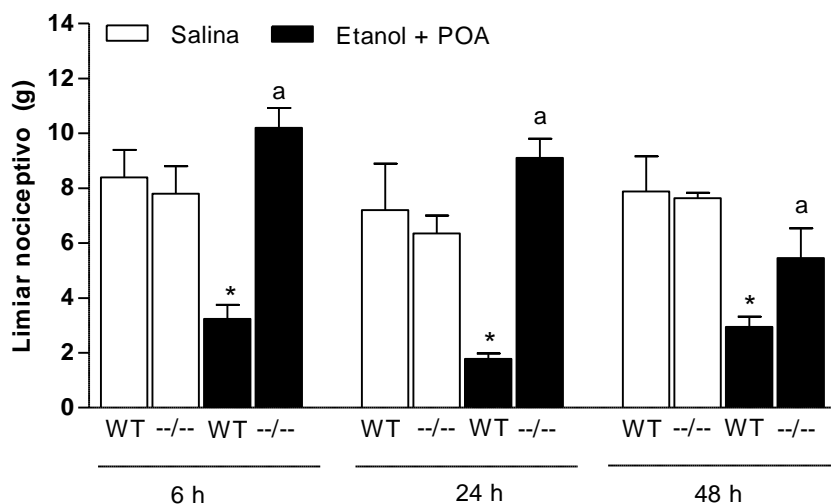


Figura 26. Deleção gênica do componente Caspase-1 do inflamossoma NPLR 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica em camundongos C57BL. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e a, com análogo sem a deleção.

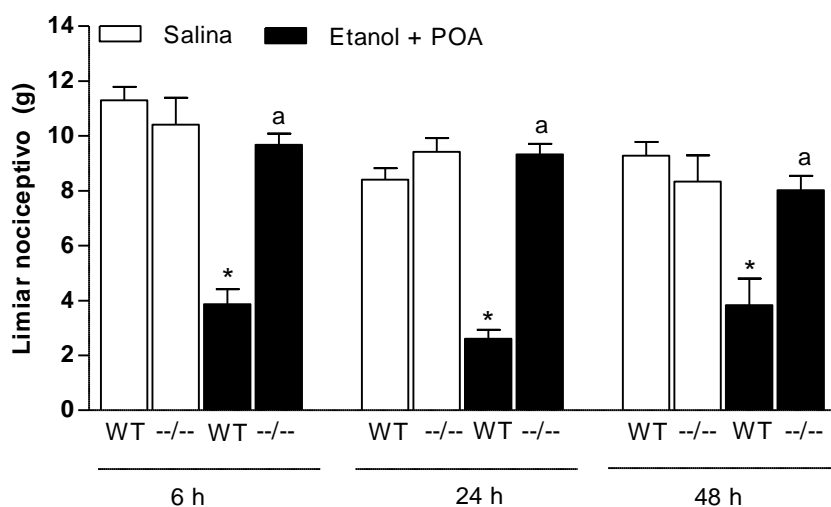


Figura 27. Deleção gênica do receptor IL1-R causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica em camundongos C57BL. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0.05$, * quando comparado com salina e a, com análogo sem a deleção.

Por fim, foi avaliado o efeito do KO para IL-18 (Figura 28). O resultado obtido mostra que houve significativa elevação do limiar nociceptivo no KO que recebeu

etanol + POA quando comparado ao seu análogo WT nos tempos de 6h (IL-18 (-/-) etanol + POA: $6,2 \pm 0,8$ g versus WT etanol + POA: $3,2 \pm 0,5$ g), 24h (IL-18 (-/-) etanol + POA: $8,4 \pm 0,9$ g versus WT etanol + POA: $1,8 \pm 0,2$ g) e 48h (IL-18 (-/-) etanol + POA: $7,6 \pm 0,7$ g versus WT etanol + POA: $2,9 \pm 0,4$ g). Os limiares basais não apresentaram diferenças significativas (salina WT: $8,4 \pm 0,28$ g, etanol + POA WT: $9,3 \pm 0,42$ g, salina KO: $7,9 \pm 0,34$ g, etanol + POA KO: $9,1 \pm 0,32$ g).

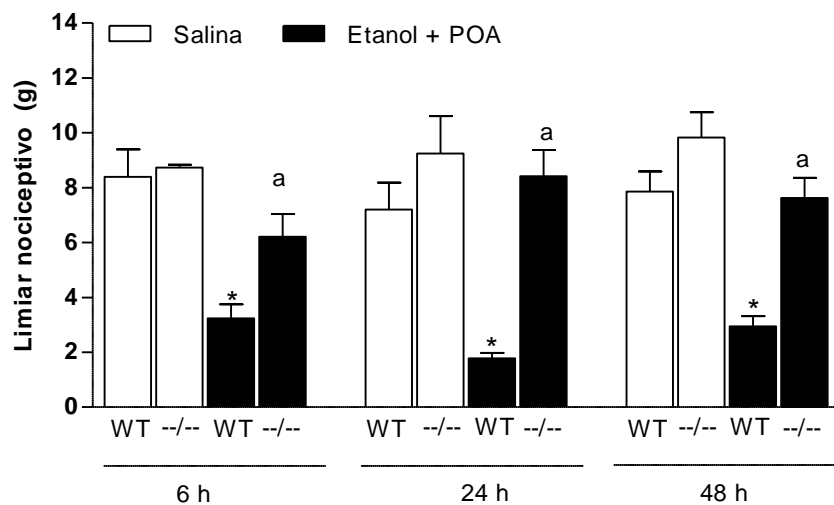


Figura 28. Deleção gênica do componente IL-18 do inflamossoma NPLR 3 causa aumento dos limiares nociceptivos na pancreatite alcoólica em camundongos C57BL. Dados expressos com Média \pm EP. ANOVA seguido por teste de Bonferroni, n de 6 a 8, $p < 0,05$, * quando comparado com salina e a, com análogo sem a deleção.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstrou pioneiramente que a pancreatite alcoólica experimental cursa com significativa hiperalgesia, sendo essa persistente, cujo mecanismo ocorre através de receptores purinérgicos e ativação do inflamossoma NPLR3. Identificamos ainda que macrófagos e mastócitos são células envolvidas nessas alterações nociceptivas.

O modelo utilizado nesse estudo utiliza o etanol e o ácido palmitoléico (POA) como agentes indutores da pancreatite. O POA é um étil-éster de ácido graxo, sendo um dos metabólitos da via não-oxidativa do etanol. A idéia de que os ácidos graxos podem ter importância no mecanismo fisiopatológico da pancreatite alcoólica não é uma novidade, tendo em vista que desde 1986 pesquisas já apontavam que pâncreas de humano danificados pelo abuso de etanol apresentavam elevadas concentrações desses metabólitos (Laposata e Lange, 1986). Estudo posterior mostrou que a administração intra-arterial em ratos de etil-palmitato, um étil éster de ácido graxo (FAEE), causou no pâncreas edema, ativação de tripsinogênio e vacuolização de células acinares. Fígado, pulmão, coração, músculo esquelético e gordura subcutânea não foram afetados (Werner *et al.*, 1997). Outro trabalho mostra que etanol intravenoso é capaz de promover lesão pancreática específica, com elevação de FAEE no plasma e no pâncreas, sendo esse aumento e inflamação pancreática exacerbados com a inibição farmacológica da via oxidativa (Werner *et al.*, 2002).

A utilização de um modelo experimental cuja pancreatite fosse induzida pela combinação de etanol e um desses metabólitos é bastante recente. Foi utilizado nesse estudo mesmo método de Huang *et al.* (2014), que demonstrou que injeções intraperitoneais de etanol associado ao POA eram capazes de levar à lesão pancreática severa e inflamação. Essa combinação foi capaz de alterar a homeostase do cálcio citosólico, resultando em dano mitocondrial e necrose de células acinares. Esse modelo apresenta grande facilidade de reprodução e possui relevância clínica, pois se apóia na evidência epidemiológica de que a hipertrigliceridemia é um fator de risco para a pancreatite (Yadav e Pitchumoni, 2003; Wang *et al.*, 2009).

Além da hipertrigliceridemia, outros fatores têm sido relacionados à inicialização da pancreatite, tais como a dieta, a quantidade e o tipo de álcool consumido, o padrão de consumo, o tabagismo e os fatores hereditários (Yadav e Lowenfels, 2013).

Os resultados dessa pesquisa foram divididos em três blocos. Primeiramente, foi realizada a caracterização da pancreatite alcoólica no que se refere às alterações no estado geral do animal, nos parâmetros inflamatórios e no estresse oxidativo. No segundo bloco foram investigadas as alterações nociceptivas, avaliando, ainda a participação de células residentes nesse fenômeno. No terceiro bloco, foi explorada a modulação da nocicepção por meio do bloqueio farmacológico dos receptores purinérgicos e avaliada a participação de componentes do inflamossoma NPLR 3 por meio do uso de animais *Knockout*.

Ao invés de camundongos da linhagem C57BL foram utilizados *Swiss* na maior parte da caracterização da pancreatite. O objetivo disto foi verificar se o modelo era consistente também para esse tipo de animal, padronizando-o, já que, com maior similaridade aos humanos, os camundongos *Swiss* apresentam maior variabilidade gênica (Groen e Lagerwerf, 1979). O modelo utilizado foi eficiente em produzir alterações típicas da pancreatite nesse tipo de animal: aumento sérico dos níveis de lipase e amilase, alterações histopatológicas, aumento do infiltrado neutrofílico, de citocinas, de marcadores de estresse oxidativo e alterações nociceptivas.

Diferente do que foi encontrado para o C57BL (Huang *et al.*, 2014), o uso do etanol isolado causou alterações pancreáticas, embora mais brandas e menos persistentes. Essa diferença provavelmente é decorrente de variações metabólicas existentes entre essas linhagens (Wade e Daly, 2005). Além disso, o álcool isoladamente pode agir diretamente sobre células acinares, causando elevação do cálcio citosólico, embora de forma não sustentada, como a encontrada quando está associado ao POA (Huang *et al.*, 2014). O trabalho de Huang e colaboradores (2014) investigou apenas o tempo de 24h, o que também impede de ser visto se o etanol isolado não causou nenhuma alteração anterior ou posterior a esse tempo.

Para avaliarmos o estado geral do animal foram utilizadas duas variáveis: a curva ponderal e de sobrevivência.

O ganho ponderal é um forte indicador da condição de bem-estar do animal (Andrade *et al.*, 2006). Observamos que a pancreatite alcoólica cursa com

significativa perda de peso. Uma das causas para isso pode ser a ocorrência de dor, já que, é relatado na literatura associação dos episódios dolorosos com alimentação, devido à ativação enzimática que ocorre no processo digestivo ter a capacidade de intensificar a inflamação em curso (Chebli *et al.*, 2011). Na clínica, observa-se que os pacientes que apresentam quadros mais graves, com náuseas, vômitos e dor não toleram a alimentação oral, sendo necessária a suspensão da dieta até cessarem esses sinais. Já se sabe atualmente que há benefício na introdução precoce da alimentação enteral, sendo essa conduta superior ao uso da via parenteral (Janisch e Gardner, 2016; Portelli e Jones, 2017). Além da perda de peso, outras alterações são sugestivas de dor e de alteração do estado geral em camundongos, tais como alterações de comportamento para a espécie, postura arqueada, vocalização ao ser manuseado e piloereção (NEVES *et al.* 2013).

No nosso trabalho observamos que a pancreatite alcoólica cursou ainda com significativa diminuição da sobrevida. Os valores encontrados por nós foram similares aos obtidos no trabalho de Pal *et al.* (2012), contudo este sendo realizado em humanos, quando mais de 50% da área pancreática estava em necrose, cuja sobrevida foi de 60%, sendo esta a forma clínica de maior gravidade. Quando menos de 50% de área pancreática estava em necrose, com sobrevida foi de 95% (Pal *et al.*, 2012).

A necrose tem se mostrado um evento-chave no agravamento da pancreatite (Criddle *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2012). Estudo *in vitro* demonstrou aumento de necrose de células acinares isoladas quando incubadas com etanol + POA (Huang *et al.*, 2014). O equilíbrio necrose-apoptose é essencial para a homeostase da célula acinar. A ativação da morte celular por apoptose é considerada menos prejudicial que a necrose, uma vez que permite que os detritos celulares sejam efetivamente removidos por macrófagos (Melino *et al.*, 2005). A necrose pode induzir uma resposta inflamatória nos tecidos circundantes ao pâncreas (Kloppel e Maillet, 1993; Criddle *et al.*, 2007), o que pode evoluir com a ocorrência de complicações sistêmicas, dentre elas, as disfunções pulmonares e a sepse, reduzindo a sobrevida (Pal *et al.*, 2012).

Demonstramos que, de forma similar ao que ocorre na clínica, houve elevação dos níveis séricos de amilase e lipase. Essas enzimas são frequentemente utilizadas na investigação laboratorial de rotina, principalmente devido à simplicidade técnica, baixo custo e alta disponibilidade embora atualmente sejam

muito questionadas como bons marcadores porque não se correlacionam com a gravidade (Yadav *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2016). Níveis superiores a três vezes o limite superior suportam a hipótese diagnóstica de pancreatite (Banks *et al.*, 2013). Encontramos ainda que as alterações de amilase e lipase seguem um perfil temporal similar ao que ocorre nos humanos com pancreatite. A amilase eleva-se primeiramente e permanecendo menos tempo alterada, e a lipase, eleva-se mais tardiamente e persiste por maior tempo (Pacheco *et al.*, 2003; Hofmeyr *et al.*, 2014). A lipase é considerada um marcador de maior especificidade, sobretudo nos casos com apresentação clínica mais tardia (Pacheco *et al.*, 2003).

Além das alterações que a pancreatite causa no nível de enzimas pancreáticas, essa patologia cursa com a ativação de uma cascata inflamatória, que envolve edema pancreático, necrose de células acinares, migração de neutrófilos, ativação de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (Chan e Leung, 2007). Há uma tendência atual de colocar os eventos inflamatórios como cruciais ao desenvolvimento da pancreatite, havendo muitas lacunas nesse mecanismo fisiopatológico (Dawra *et al.*, 2011).

Nossa pesquisa mostrou que na pancreatite alcoólica há alterações histopatológicas (edema, infiltrado de células inflamatórias, necrose), havendo significativa migração de neutrófilos. A liberação de sinais por meio de células acinares poderia mediar o recrutamento e ativação de células inflamatórias circulantes, como as células mononucleares do sangue periférico e os neutrófilos polimorfonucleares. A ativação excessiva desses leucócitos levaria à resposta inflamatória sistêmica, que deflagra a pancreatite severa, responsável por altas taxas de mortalidade e morbidade (Yang *et al.*, 2015).

Neutrófilos ativados modulam o microambiente inflamatório, alteram a rotatividade de proteínas-chave e a liberação de mediadores inflamatórios. Durante a inflamação persistente, os neutrófilos ativados, sequencialmente, liberam algumas proteínas granulares específicas, que são responsáveis pela ativação de células endoteliais e alterações na permeabilidade na parede vascular, que levam ao edema. Subsequentemente, os neutrófilos da inflamação são capturados e migram da circulação para os tecidos através da via paracelular, formando agregados em torno do local da lesão, aumentando os ROS, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada de (NADPH oxidase) e grânulos com atividade enzimática. Além disso, produzem citocinas pró-inflamatórias, intensificando as reações já instaladas (Yang

et al., 2015). O etanol hipersensibiliza monócitos diretamente, que secretam citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para intensificação da inflamação presente na pancreatite (Szabo *et al.*, 2007).

Nós demonstramos nesse estudo que as citocinas IL-1 β e MCP-1 encontram-se elevadas no pâncreas de animais com pancreatite alcoólica, sendo este aumento em 3,31 e 5,73 vezes, respectivamente. Acreditamos que o receptor IL-1R seja importante para a ação da IL-1 β , pois demonstramos atenuação da resposta nociceptiva com uso de animais que não expressavam esse receptor. Avaliamos ainda os níveis séricos de TNF- α e IL-6, contudo os mesmos não apresentaram diferenças estatísticas. Verificamos ainda, por meio do uso de animais geneticamente modificados, que IL-18 é uma citocina importante na hiperalgesia deflagrada pela pancreatite alcoólica.

IL-1 β é uma citocina sintetizada por muitas células, mas, sobretudo, por macrófagos e neutrófilos no curso da pancreatite aguda, sendo suas ações executadas por meio do IL-1R (Fink e Norman, 1996). Foi demonstrado um significativo efeito protetor no tecido pancreático e atenuação da severidade da pancreatite e limitação do envolvimento de órgãos distantes em modelos de pancreatite com uso de antagonistas IL-1R (Norman, J. *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). Trabalho que utilizou animais *Knockout* para IL-1R demonstram que esse receptor não é necessário para a inicialização da pancreatite, mas que o máximo grau de inflamação, necrose e edema não pode ser obtido em sua ausência (Norman *et al.*, 1996). Já foi demonstrado que a pancreatite induzida por ceruleína é capaz de aumentar a expressão de pró-IL-1 β , sendo esse efeito mediado pela ativação de receptores TLR9 e P2X7, ambos ativadores do inflamossoma NLRP 3 (Hoque *et al.*, 2011). Apesar de esta citocina estar fortemente relacionada a eventos à hiperalgesia inflamatória, sobretudo como efetora da ativação do inflamossoma NLRP 3 (Cunha *et al.*, 2010), essa via ainda foi pouco explorada na nocicepção visceral (Meotti *et al.*, 2007; Gadotti *et al.*, 2012), sendo a maior parte dos estudos em modelo de contorções abdominais por ácido acético, que é considerado inespecífico. Apenas dois trabalhos exploraram modelos com maior relevância clínica, um explorou a hiperalgesia na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (Dietrich *et al.*, 2015) e outro, na hiper-reatividade da bexiga induzida pela resiniferatoxina (Yokoyama *et al.*, 2013).

MCP-1 vem sendo mostrada como uma citocina-chave no curso da doença pancreática aguda, causando danos locais e liberação de fatores inflamatórios que afetam outros órgãos (Kamath *et al.*, 2016). Houve aumento da expressão de MCP-1 no pâncreas de ratos com pancreatite induzida pela injeção de 6 doses de ceruleína, havendo maior marcação por imunohistoquímica de células pancreáticas e neutrófilos (Yu e Kim, 2014). Estudo clínico mostrou que os pacientes que apresentavam pancreatite moderada tinham pico dos níveis séricos de MCP-1 no 4º dia, mas que os pacientes com pancreatite severa esse aumento era mais rápido, estando seu pico no 1º dia de doença. Isso coloca essa citocina como um promissor marcador de severidade da pancreatite (Yang *et al.*, 2016).

Níveis de IL-18 séricos foram encontrados em pacientes com pancreatite aguda, sendo sugerida como marcadora da severidade da doença (Wereszczynska-Siemiatkowska *et al.*, 2004). Foi verificado ainda que a elevação no nível sérico dessa citocina não é unicamente no curso da doença, mas persiste até 4 semanas após a reabilitação do paciente (Ueda *et al.*, 2006). Os efeitos biológicos dessa citocina ainda são pouco explorados, contudo, sabe-se que ela tem ação pleiotrópica, podendo ter efeitos anti ou pró-inflamatórios (Janiak *et al.*, 2015). Há evidências de que seu impacto na pancreatite seja por influenciar as células imunes, principalmente via IL-1 β e TNF- α , a secretar outras citocinas, bem como por estimular o aumento da expressão de moléculas de adesão, o que leva ao aumento da migração de neutrófilos (Wereszczynska-Siemiatkowska *et al.*, 2004; Perejaslov *et al.*, 2008). Essa ativação de neutrófilos pode levar a uma inflamação que leva à falência múltipla de órgãos e à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Janiak *et al.*, 2015).

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas nos níveis de IL-6 e TNF- α em nosso trabalho, vários trabalhos mostraram que essas citocinas são importantes no curso da pancreatite. IL-6 foi encontrada elevada em pacientes com pancreatite em comparação com saudáveis (Berney *et al.*, 1999). A neutralização de IL-6 com anticorpos anti-IL-6 reduziu a gravidade da PA, sugerindo essa citocina como um importante marcador de severidade da doença (Chao *et al.*, 2006). Adicionalmente, o TNF- α desempenha papel relevante na pancreatite, contribuindo para a resposta inflamatória no curso da doença (Norman, J. *et al.*, 1995; Norman, J. G. *et al.*, 1995; Schafer *et al.*, 2005; Malleo *et al.*, 2007). Sua detecção é difícil, pois é rapidamente eliminado pelo fígado (Grewal *et al.*, 1994). Como avaliamos

apenas um tempo, provavelmente este não seja o pico do nível das mesmas na evolução da doença, não podendo descartar a sua importância. No caso da avaliação do TNF- α , a sua rápida depuração pode ser um fator a mais para justificar a sua dificuldade em ser detectado.

No que se refere ao estresse oxidativo, nossos resultados mostraram que houve diminuição dos níveis de GSH no pâncreas e aumento dos níveis de MDA plasmáticos dos animais com pancreatite alcoólica, demonstrando que ocorreu desequilíbrio entre a produção e inativação dos ROS. Peroxidação de lipídios de membrana por ROS libera subprodutos tóxicos, tais como o MDA, que leva à ativação de citocinas, da cascata do complemento, resultando em resposta inflamatória sistêmica. MDA é diretamente relacionado com injúria tecidual na pancreatite aguda, sendo considerado um marcador de severidade em estágios iniciais (Wereszczynska *et al.*, 1998). GSH é uma enzima que participa da defesa antioxidante. Diminuição da glutathiona no pâncreas é sugestivo de estresse oxidativo, tanto local quanto sistêmico (Demols *et al.*, 2000). Estudo anterior que utilizou um modelo de pancreatite induzida pela injeção de etanol no ducto biliar comum de ratos mostrou resultado similar, analisando os mesmos marcadores (Kiziler *et al.*, 2008).

Apesar de vários estudos experimentais terem apontado a modulação do estresse oxidativo como uma via promissora na pancreatite, os estudos clínicos não reproduziram essas experiências. Provavelmente, essa falha na translação se deva ao fato de a maioria dos estudos experimentais explorarem o pré-tratamento e não a avaliação pós-lesão (Armstrong *et al.*, 2013).

Após a caracterização do modelo de pancreatite alcoólica utilizado no estudo, buscamos avaliar se a pancreatite alcoólica cursava com hiperalgesia visceral. A dor na pancreatite é uma das mais importantes características clínicas, sendo um sintoma precoce e afetando cerca de 90% dos pacientes. O tratamento da dor ainda permanece um desafio em virtude da escassez de conhecimentos sobre os processos neurobiológicos e neuronais subjacentes a essa patologia (Frossard *et al.*, 2008; Barreto e Saccone, 2012; Jurik *et al.*, 2015).

Os mecanismos de ativação dos caminhos da dor pancreática ainda não foram completamente elucidados, havendo muitas lacunas no que se refere às vias e aos receptores envolvidos. A ativação neuronal parece ser decorrente do processo digestivo e inflamatório que ocorre em células acinares, contudo pode

haver ainda influência de fenômenos obstrutivos, tais como a obstrução de ductos por cálculos biliares ou a formação de pseudocistos (Mayerle *et al.*, 2004). A inflamação pancreática e suas sequelas causam significativas mudanças nos neurônios sensoriais viscerais, medula espinhal e estruturas supra-espinhais. Vários agentes biológicos, tais como, neurotrofinas, prostanóides, bradicinina e várias citocinas podem sensibilizar nociceptores, levando à ativação nociceptiva (Barreto e Saccone, 2012). A pancreatite pode ainda cursar com dor neuropática, na qual danos diretos nas terminações nervosas levam à sua sensibilização (Lindsay *et al.*, 2005; Scholz e Woolf, 2007).

Na maior parte dos estudos experimentais, assim como no nosso, os eventos nociceptivos são mensurados através do teste de hiperalgesia mecânica abdominal, que consiste na resposta de retirada do abdômen após estimulação mecânica do mesmo, característica similar à clínica (Mogil, 2009). Esse teste capta alterações nociceptivas, sendo estas verificadas pelo aumento da resposta a um estímulo doloroso em áreas adjacentes à lesão, sendo decorrente de sensibilização periférica e central (Woolf, 2011).

Já é conhecido que o etanol pode evocar efeitos estimulantes ou depressores sob o sistema nervoso central, a depender da dose (Matchett e Erickson, 1977). Esse fato poderia alterar a reação de retirada, obtida através do teste de hiperalgesia mecânica abdominal. Em virtude disso, buscamos investigar o efeito do etanol e a duração do mesmo sob a locomoção após o protocolo de indução da pancreatite.

Já é relatado na literatura que doses baixas produzem significativa estimulação, as intermediárias, efeito bifásico, e altas doses causam depressão, tendo a maioria dos animais perdido os reflexos de retificação. As altas doses causavam efeito depressor pelo período de 2h (Matchett e Erickson, 1977). O nosso estudo verificou que a dose utilizada na indução da pancreatite alcoólica causa efeito depressor, que perdurou por 2h. Como os tempos analisados no Von Frey foram a partir de 6h, já não havia influência desse efeito depressor, que pudessem influenciar nos resultados obtidos.

Esse estudo demonstrou pela primeira vez, para um modelo de pancreatite aguda alcoólica, o curso temporal da hiperalgesia visceral. Observamos que a pancreatite deflagra uma persistente sensibilização visceral, que se inicia em 6h e prossegue até 72h, tornando-se imperceptível em 96h. Além disso, demonstramos

que houve aumento na expressão de c-FOS na medula torácica dos animais com pancreatite, mostrando que, de fato, há uma sensibilização central atrelada ao comportamento nociceptivo observado. Essa proteína é largamente aceita como um marcador de ativação neuronal por um estímulo nociceptivo (Jurik *et al.*, 2015). O fato de utilizarmos um modelo reprodutível e com utilização de agentes indutores de importância na clínica torna muito relevante o estudo da nocicepção, com maior possibilidade de, no futuro, se obter estudos translacionais.

Assim como observado na clínica de pacientes com pancreatite, os animais demonstram alterações reflexas nociceptivas similares à dor referida, pela qual as sensações nociceptivas são captadas nos dermatômos abdominais que recebem a mesma inervação dos segmentos espinhais que inervam os órgãos viscerais onde se originaram os estímulos nociceptivos (Giamberardino *et al.*, 1995; Wesselmann *et al.*, 1998). Captamos em nosso estudo alterações nociceptivas no abdômen superior, local frequentemente relacionado com a pancreatite.

Ainda explorando os eventos nociceptivos no curso da pancreatite, investigamos o papel de macrófagos e mastócitos por meio de protocolos experimentais nos quais essas células foram depletadas e degranuladas, respectivamente. Mostramos que tanto macrófagos quanto mastócitos desempenham importante papel na ocorrência da hiperalgesia visceral.

Apesar de o macrófago estar sendo apontado como uma importante célula na inicialização e desenvolvimento da pancreatite, mediando à ocorrência de vários fenômenos pró-inflamatórios (Manohar *et al.*, 2017), a sua relação com nocicepção pancreática ainda não havia sido demonstrada. Estudo anterior com estimulação de inflamação visceral por meio da injeção intravesical de LPS demonstrou que há aumento da expressão de MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) e do RNAm para essa proteína na bexiga e na medula associados com aumento de c-FOS na medula (Meyer-Siegler *et al.*, 2004). Esses achados reforçam o que encontramos, colocando o macrófago como uma célula importante na nocicepção, podendo ser um elo entre a ocorrência de eventos inflamatórios e neurais. Além disso, o macrófago é um dos principais responsáveis pela secreção e liberação de IL1- β (Hoque *et al.*, 2011). Esta citocina encontra-se presente na hiperalgesia inflamatória, podendo mediar, inclusive ativação espinhal, colaborando para inicialização e manutenção dos estados de dor (White e Jones, 2008). O fato de termos encontrado níveis elevados de IL1- β na pancreatite alcoólica nos leva a

inferir que a ação dos macrófagos na nocicepção possa ser mediada por essa citocina.

Quanto aos mastócitos, pesquisas anteriores já haviam apontado que estas células tinham importância em estados de dor visceral, embora não tenham sido utilizados modelos de pancreatite. Mastócitos e mediadores liberados por estas células nas proximidades da inervação da mucosa intestinal foram positivamente correlacionados com dor visceral em pacientes com síndrome do intestino irritável (Barbara *et al.*, 2004). Adicionalmente, foi demonstrado que produtos de mastócitos obtidos da mucosa intestinal de pacientes com síndrome do intestino irritável, ricos em histamina e triptase, podem excitar nervos sensoriais viscerais e neurônios da DRG isolados de ratos (Barbara *et al.*, 2007). A importância dos mastócitos na pancreatite aguda já vem sendo reportada, atuando na deflagração da pancreatite, mediando tanto a lesão local quanto a sistêmica (Lopez-Font *et al.*, 2010). Foi demonstrado que na pancreatite crônica há incremento de mastócitos ao redor de neurônios intrapancreáticos, sugerindo que os mesmos possam induzir hipersensibilidade visceral (Demir *et al.*, 2013). Todas essas evidências reforçam nossos dados, que demonstram que o mastócito é uma célula envolvida na hiperalgia pancreática, tendo em vista que ao degranularmos houve um aumento significativo dos limiares nociceptivos obtidos. O fato de o mastócito ser uma célula liberadora de ATP nos direciona a hipotetizar a participação desse mediador nos eventos influenciados por esta célula (Kurashima *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que macrófagos e mastócitos são essenciais na dor inflamatória por meio dos mesmos protocolos experimentais que foram utilizados nesse estudo. A pancreatite aguda tem um forte componente inflamatório, podendo haver associada peritonite, uma complicação comumente encontrada na clínica. Portanto, não podemos excluir que a peritonite seja um evento de importância nas alterações nociceptivas observadas, bem como no papel de macrófagos e mastócitos sobre esses fenômenos (Ribeiro *et al.*, 2000).

Em um terceiro momento do nosso estudo, exploramos o envolvimento dos receptores purinérgicos na hiperalgia decorrente da pancreatite alcoólica. Posteriormente, pesquisamos se havia envolvimento do inflamosoma NLRP 3 via ativação do receptor P2X7 nesse fenômeno.

A hipótese do envolvimento dos receptores purinérgicos na hiperalgia baseou-se no fato de que os mesmos serem largamente expressos no pâncreas,

desempenhando tanto funções endócrinas quanto exócrinas, podendo alterar sua expressão em estados patológicos (Burnstock e Novak, 2012). Além disso, são largamente expressos em neurônios sensoriais e DRG (Burnstock, 2013). Um de seus principais ligantes, o ATP, é um importante co-transmissor nos nervos, tanto na periferia, quanto no SNC (Burnstock, 2007), podendo sua liberação ser originada de células danificadas (Burnstock, 2013).

Os receptores purinérgicos são classificados em P1, ativados por adenosina e P2, ativados por ATP e ADP. Os P2 se subdividem em P2X, canais catiônicos não-seletivos ativados por ligantes, e P2Y, metabotrópicos, acoplados à proteína G. Exploramos nesse estudo os receptores do tipo P2, especialmente P2X7 (Burnstock, 2013).

Mostramos de forma pioneira que a hiperalgisia da pancreatite alcoólica é modulada pela administração sistêmica e intratecal de bloqueadores purinérgicos, sendo esse efeito, principalmente devido à ação do receptor P2X7.

O efeito anti-nociceptivo do bloqueio do receptor P2X7 não foi atrelado ao efeito anti-inflamatório. Isso provavelmente decorreu de termos realizado pós-tratamento, com a administração de apenas uma dose, que poderia ter modulado a nocicepção por meio da ação no SNC, já que esse fármaco é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Confirmamos essa evidência já que houve a manutenção do efeito do BBG quando realizada a administração intratecal. Trata-se de uma novidade a ação desse receptor modulando a dor aguda, pois antes só havia evidências da capacidade da modulação central por essa via na fase crônica (Liu *et al.*, 2015).

Nossos dados comprovam ainda que o inflamossoma NLRP 3 está envolvido na hiperalgisia desencadeada pela pancreatite. Acreditamos que o receptor P2X7 seja o responsável, pelo menos em parte, pela ativação dessa via (Figura 28).

Inflamossomas são complexos multiprotéicos citoplasmáticos que medeiam a maturação de citocinas pró-inflamatórias. Um dos mais conhecidos e estudados é o inflamossoma NLRP 3 devido sua associação com importantes doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como Alzheimer, diabetes tipo II, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais (Wen *et al.*, 2012).

O inflamossoma NLRP 3 é um complexo de proteínas citosólicas, constituído por NPLR 3, proteína ASC e pró-caspase-1. Ao ser ativado, permite a conversão da caspase-1 em sua forma ativa, o que deflagra a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18, o

que permite a liberação das mesmas em suas formas ativas. Uma ampla gama de estímulos tem sido proposta para promover a ativação desse inflamossoma, incluindo ATP extracelular, NAD e ácidos graxos livres saturados.

Estudos explorando a relação dos receptores purinérgicos e pancreatite ainda são escassos. O primeiro trabalho com essa temática mostrou aumento da expressão do gene para o receptor P2X3 na pancreatite aguda induzida por ceruleína (Bazargan *et al.*, 2012). Outro trabalho demonstrou o envolvimento do inflamossoma NLR3, que pode ser ativado por receptores TLR9 e P2X7 na inicialização da pancreatite induzida por ceruleína (Hoque *et al.*, 2011), sem, contudo, explorar eventos nociceptivos. Apenas dois estudos que exploraram a relação dos receptores purinérgicos com nocicepção pancreática, contudo foram realizados em modelos crônicos, com a utilização do TNBS como indutor. O primeiro mostrou que a micróglia espinhal medeia a sensibilização central na dor crônica visceral (Liu *et al.*, 2015) e, o segundo, mostrou que a sensibilização do receptor P2X3 via sinalização adrenérgica em neurônios primários contribuem para a dor pancreática (Wang *et al.*, 2015). O nosso trabalho, portanto, foi o primeiro a mostrar que a pancreatite aguda alcoólica pode ser modulada pelo bloqueio purinérgico, mostrando ainda, que além há um componente central envolvido nesse efeito.

Hipotetizamos duas vias pelas quais o receptor purinérgico possa estar interferindo na atividade do inflamossoma NLRP 3: a primeira refere-se a um efeito direto à nível do SNC, seja a nível espinhal ou supra-espinhal (Figura 28). Nesse contexto, estimulação neuronal periférica levaria a uma sensibilização central que poderia ser modulada pela micróglia a via inflamossoma NLRP 3. Já foi demonstrado que a microfilia, quando estimulada, pode liberar IL1- β , tornando a dor mais persistente (Chu *et al.*, 2010). Várias doenças tem mostrado que células do sistema nervoso central possuem toda a maquinaria protéica necessária para a produção de todos os componentes dessa via (Kummer *et al.*, 2007; Salminen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). A célula com função fagocítica no SNC, a microglia, tem uma elevada expressão de receptores P2X7 (Neary e Zimmermann, 2009) Os nossos dados abrem perspectivas para aprofundamento nesse mecanismo.

Por meio dos nossos dados, outro caminho foi demonstrado: a ativação do inflamossoma NLRP 3 por meio dos receptores purinérgicos é uma via mecânica para a hiperalgesia na pancreatite alcoólica (Figura 28). Isso trata-se de um achado

de grande relevância, pois trabalhamos com um modelo cujo agente etiológico é responsável por 45% dos casos de pancreatite (Vonlaufen *et al.*, 2014). Isso abre perspectivas para estudos translacionais.

Em nossa hipótese, a pancreatite alcoólica desencadeia a liberação de DAMPS, dentre os quais destacamos o ATP agindo em receptores P2X7, levando a ativação do inflamossoma NLRP 3. Essa ativação resulta em clivagem de pró-IL-1 β e pró-IL-18, dependente de caspase-1. Essa reação produz IL-1 β e IL-18 ativas e, posteriormente, estas serão liberadas da célula, exercendo seus efeitos pró-inflamatórios (Figura 28). Dentre esses efeitos está a intensificação da hiperalgesia secundária (Weber *et al.*, 2010).

Várias evidências corroboram com a hipótese proposta, apresentando o etanol como um agente ativador do inflamossoma NLRP 3. Ingestão crônica de etanol induz a expressão de componentes deste inflamossoma no pâncreas de ratos (Parlesak *et al.*, 2000). IL-1 β , caspase-1 e IL-18 foram expressas em espécimes pancreáticas obtidas de doentes com pancreatite aguda ou recorrência da mesma, em comparação com pessoas saudáveis (Gu *et al.*, 2013). Exposição aguda ao etanol por gavagem em camundongos induziu a expressão de NLRP 3, ASC e caspase-1 em células mononucleares hepáticas (Petrasek *et al.*, 2012). Isso reforça a importância dessa via para a pancreatite alcoólica.

Esse trabalho mostrou claramente a importância da ativação do inflamossoma NLRP 3 via receptor P2X7 para a hiperalgesia visceral pancreática, amplificando as possibilidades de modulação desse fenômeno. Novas perspectivas são abertas com essa possibilidade, inclusive a respeito da forma pela qual P2X7 ativa esse inflamossoma e o aprofundamento do mecanismo central proposto, que permanecem desconhecidos.

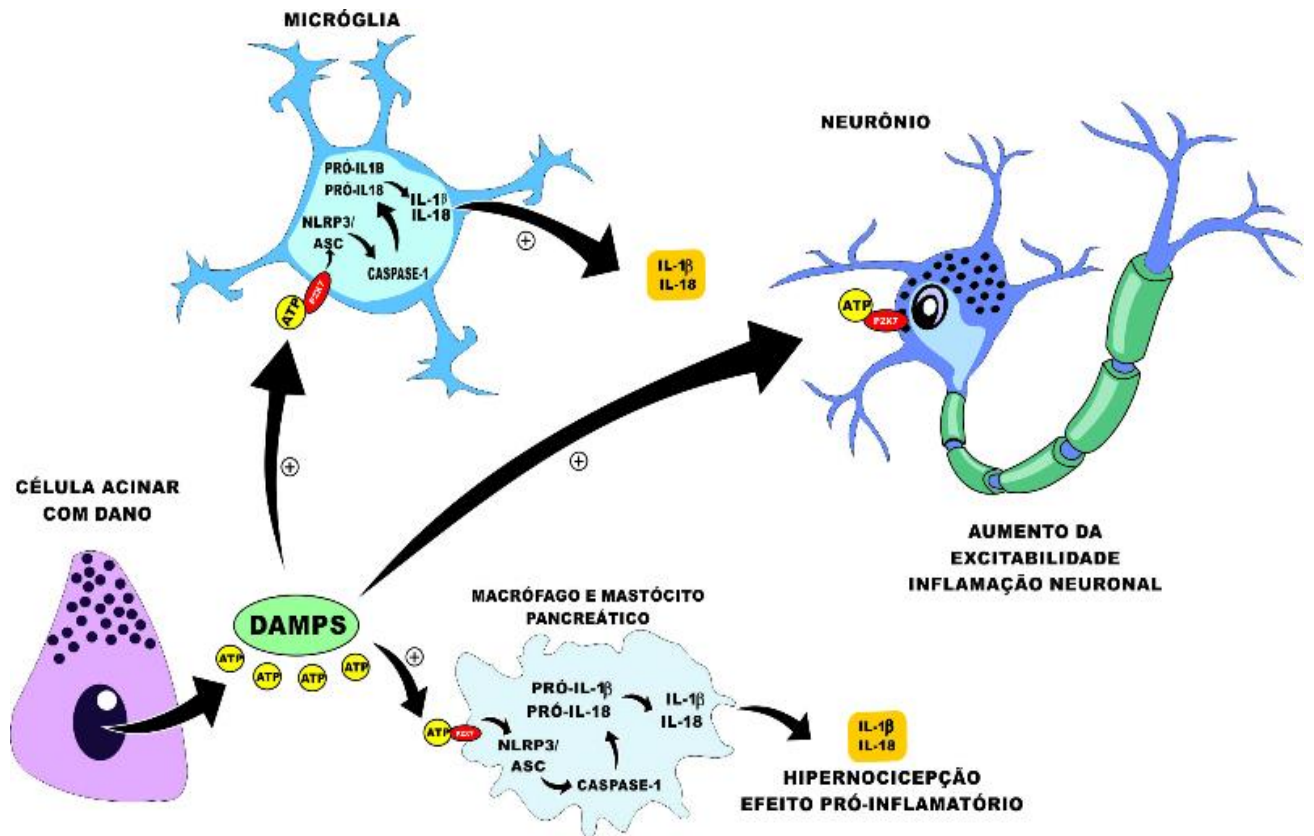


Figura 28. Resumo esquemático da hipótese mecânica para a ativação do inflamossoma NPLR3 na pancreatite aguda alcoólica, levando à hiperalgesia. Fonte: própria autora.

6. CONCLUSÃO

Na pancreatite alcoólica experimental há importante hiperalgesia visceral, que inicia-se em 6h, permanecendo até a 72h. Há participação de macrófagos e mastócitos nesse fenômeno. Além disso, há na pancreatite alcoólica significativas alterações inflamatórias, tais como edema, infiltrado de células inflamatórias e necrose pancreáticas, aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo.

Os receptores purinérgicos participam da fisiopatologia da nocicepção pancreática, sendo esse efeito principalmente em virtude do receptor P2X7, tanto a nível central quanto periférico. Pelo menos parcialmente, o efeito na nocicepção verificado pela modulação dos receptores purinérgicos ocorre via inflamossoma NLRP 3.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGTERESCH, H. J. et al. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, n. 2, p. 211-32, 1999. ISSN 0012-6667 (Print) 0012-6667 (Linking).

AHO, H. J. et al. Carboxyl ester lipase in human tissues and in acute pancreatitis. **Int J Pancreatol**, v. 5, n. 2, p. 123-34, 1989. ISSN 0169-4197 (Print) 0169-4197 (Linking).

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 12, p. 1-2, 2004. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO - Editora FIOCRUZ, 2006. ISBN 9788575413869. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=WGbRBAAAQBAJ> >.

APOLLONI, S. et al. Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 9, p. 1101-9, 2014. ISSN 1754-8411 (Electronic) 1754-8403 (Linking).

APTE, M. V. et al. Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. **J Lab Clin Med**, v. 125, n. 5, p. 634-40, 1995. ISSN 0022-2143 (Print) 0022-2143 (Linking).

ARMSTRONG, J. A. et al. Oxidative stress in acute pancreatitis: lost in translation? **Free Radic Res**, v. 47, n. 11, p. 917-33, 2013. ISSN 1029-2470 (Electronic) 1029-2470 (Linking).

ASSREUY, A. M. et al. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol Reprod**, v. 67, n. 6, p. 1796-803, 2002. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking).

BANKS, P. A. et al. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. **Gut**, v. 62, n. 1, p. 102-11, 2013. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749 (Linking).

BANKS, P. A.; FREEMAN, M. L. Practice guidelines in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 101, n. 10, p. 2379-400, 2006. ISSN 0002-9270 (Print) 0002-9270 (Linking).

BARBARA, G. et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 126, n. 3, p. 693-702, 2004. ISSN 0016-5085 (Print)
0016-5085 (Linking).

BARBARA, G. et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 26-37, 2007. ISSN 0016-5085 (Print)
0016-5085 (Linking).

BARRETO, S. G.; SACCONI, G. T. Pancreatic nociception--revisiting the physiology and pathophysiology. **Pancreatology**, v. 12, n. 2, p. 104-12, 2012. ISSN 1424-3911 (Electronic)
1424-3903 (Linking).

BASURTO ONA, X.; RIGAU COMAS, D.; URRUTIA, G. Opioids for acute pancreatitis pain. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 26, n. 7, 2013. ISSN 1469-493X (Electronic)
1361-6137 (Linking).

BAUERNFEIND, F. et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 5, p. 765-83, 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic)
1420-682X (Linking).

BAZARGAN, M. et al. **Pain-related gene expression profile during the onset and resolution of caerulein-induced acute pancreatitis in mice.** *Pancreatology*. 2012 Jan-Feb;12(1):41-3. doi: 10.1016/j.pan.2011.12.004. Epub 2011 Dec 10., 2012. ISBN 1424-3911 (Electronic)
1424-3903 (Linking).

BECKER, C. E.; O'NEILL, L. A. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 3, p. 239-48, 2007. ISSN 1863-2297 (Print)
1863-2297 (Linking).

BEDOYA, F.; SANDLER, L. L.; HARTON, J. A. Pyrin-only protein 2 modulates NF-kappaB and disrupts ASC:CLR interactions. **J Immunol**, v. 178, n. 6, p. 3837-45, 2007. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking).

BENKO, S.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 368-73, 2008. ISSN 1096-0023 (Electronic)
1043-4666 (Linking).

BERNEY, T. et al. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 18, n. 4, p. 371-7, 1999. ISSN 0885-3177 (Print)
0885-3177 (Linking).

BESSION, J. M. R.; GUILBAUD, G.; OLLAT, H. **Peripheral Neurons in Nociception: Physio-pharmacological Aspects**. John Libbey Eurotext, 1994. ISBN 9782742000814. Disponível em: <
<https://books.google.com.mx/books?id=gmDtOT7LCKcC> >.

BEST, C. A.; LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. **Front Biosci**, v. 1, n. 8, p. e202-17, 2003. ISSN 1093-9946 (Print)
 1093-4715 (Linking).

BHATIA, M. et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 5, n. 2-3, p. 132-44, 2005. ISSN 1424-3903 (Print)
 1424-3903 (Linking).

BLIND, P. J. et al. Carboxylic ester hydrolase. A sensitive serum marker and indicator of severity of acute pancreatitis. **Int J Pancreatol**, v. 8, n. 1, p. 65-73, 1991. ISSN 0169-4197 (Print)
 0169-4197 (Linking).

BOLLEN, T. L. et al. The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. **Br J Surg**, v. 95, n. 1, p. 6-21, 2008. ISSN 1365-2168 (Electronic)
 0007-1323 (Linking).

BONAN, C. D. et al. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. **Neurochem Res**, v. 25, n. 6, p. 775-9, 2000. ISSN 0364-3190 (Print)
 0364-3190 (Linking).

BOOTH, D. M. et al. Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe? **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 10, p. 2683-98, 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic)
 1523-0864 (Linking).

BORUCKI, K. et al. In heavy drinkers, fatty acid ethyl esters remain elevated for up to 99 hours. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 3, p. 423-7, 2007. ISSN 0145-6008 (Print)
 0145-6008 (Linking).

BRADLEY, E. L., 3RD. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. **Arch Surg**, v. 128, n. 5, p. 586-90, 1993. ISSN 0004-0010 (Print)
 0004-0010 (Linking).

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982. ISSN 0022-202X (Print)
 0022-202X (Linking).

BRANDLE, U.; KOHLER, K.; WHEELER-SCHILLING, T. H. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 62, n. 1, p. 106-9, 1998. ISSN 0169-328X (Print)
0169-328X (Linking).

BRANDLE, U.; ZENNER, H. P.; RUPPERSBERG, J. P. Gene expression of P2X-receptors in the developing inner ear of the rat. **Neurosci Lett**, v. 273, n. 2, p. 105-8, 1999. ISSN 0304-3940 (Print)
0304-3940 (Linking).

BUIJS, R. M. et al. Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. **J Comp Neurol**, v. 431, n. 4, p. 405-23, 2001. ISSN 0021-9967 (Print)
0021-9967 (Linking).

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev**, v. 24, n. 3, p. 509-81, 1972. ISSN 0031-6997 (Print)
0031-6997 (Linking).

_____. Do some nerve cells release more than one transmitter? **Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 239-48, 1976. ISSN 0306-4522 (Print)
0306-4522 (Linking).

_____. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. **Lancet**, v. 347, n. 9015, p. 1604-5, 1996. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking).

_____. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 4, p. 182-8, 2001. ISSN 0165-6147 (Print)
0165-6147 (Linking).

_____. Cotransmission. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 1, p. 47-52, 2004. ISSN 1471-4892 (Print)
1471-4892 (Linking).

_____. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 12, p. 1471-83, 2007. ISSN 1420-682X (Print)
1420-682X (Linking).

_____. Purinergic signalling: past, present and future. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 1, p. 3-8, 2009. ISSN 1414-431X (Electronic)
0100-879X (Linking).

_____. Targeting the visceral purinergic system for pain control. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 1, p. 80-6, 2012. ISSN 1471-4973 (Electronic)
1471-4892 (Linking).

_____. Purinergic mechanisms and pain--an update. **Eur J Pharmacol**, v. 716, n. 1-3, p. 24-40, 2013. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking).

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol**, v. 240, p. 31-304, 2004. ISSN 0074-7696 (Print)
0074-7696 (Linking).

BURNSTOCK, G.; NOVAK, I. Purinergic signalling in the pancreas in health and disease. **J Endocrinol**, v. 213, n. 2, p. 123-41, 2012. ISSN 1479-6805 (Electronic)
0022-0795 (Linking).

CAPURSO, G. et al. Role of the gut barrier in acute pancreatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 46, n. 51, 2012. ISSN 1539-2031 (Electronic)
0192-0790 (Linking).

CERVERO, F. Visceral versus somatic pain: similarities and differences. **Dig Dis**, v. 1, p. 3-10, 2009. ISSN 1421-9875 (Electronic)
0257-2753 (Linking).

CERVERO, F.; JANIG, W. Visceral nociceptors: a new world order? **Trends Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 374-8, 1992. ISSN 0166-2236 (Print)
0166-2236 (Linking).

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. Visceral pain. **Lancet**, v. 353, n. 9170, p. 2145-8, 1999. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking).

CERVERO, F.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. A psychophysical study of secondary hyperalgesia: evidence for increased pain to input from nociceptors. **Pain**, v. 58, n. 1, p. 21-8, 1994. ISSN 0304-3959 (Print)
0304-3959 (Linking).

CHAMAILLARD, M. et al. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 9, p. 581-92, 2003. ISSN 1462-5814 (Print)
1462-5814 (Linking).

CHAN, Y. C.; LEUNG, P. S. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. **Pancreas**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2007. ISSN 1536-4828 (Electronic)
0885-3177 (Linking).

CHAO, K. C. et al. Blockade of interleukin 6 accelerates acinar cell apoptosis and attenuates experimental acute pancreatitis in vivo. **Br J Surg**, v. 93, n. 3, p. 332-8, 2006. ISSN 0007-1323 (Print)
0007-1323 (Linking).

CHEBLI, J. M.; GABURRI, P. D.; CHEBLI, L. A. Oral refeeding in mild acute pancreatitis: an old challenge. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 2, n. 6, p. 100-2, 2011. ISSN 2150-5330 (Electronic)
2150-5330 (Linking).

CHEN, C. C. et al. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 428-31, 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking).

CHEN, L. et al. Chemical stimulation of the intracranial dura activates NALP3 inflammasome in trigeminal ganglia neurons. **Brain Res**, v. 30, p. 1-11, 2014. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

CHEN, T. H. et al. Effects of caffeine on intracellular calcium release and calcium influx in a clonal beta-cell line RINm5F. **Life Sci**, v. 58, n. 12, p. 983-90, 1996. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking).

CHIZH, B. A.; ILLES, P. P2X receptors and nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 553-68, 2001. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking).

CHU, Y. X. et al. Involvement of microglial P2X7 receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 7, p. 1176-89, 2010. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking).

CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia humana de Houssay**. Artmed, 2004. ISBN 9788536300764. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=8FjBAAAACAAJ> >.

CRIDDLE, D. N. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. **Pancreatology**, v. 15, n. 4 Suppl, p. S6-S12, 2015. ISSN 1424-3911 (Electronic) 1424-3903 (Linking).

CRIDDLE, D. N. et al. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1285-94, 2007. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047 (Linking).

CRUZ, C. M. et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. **J Biol Chem**, v. 282, n. 5, p. 2871-9, 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

CUNHA, T. M. et al. Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1beta maturation. **Mol Pain**, v. 6, n. 63, p. 1744-8069, 2010. ISSN 1744-8069 (Electronic) 1744-8069 (Linking).

DAWRA, R. et al. Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 6, p. 2210-2217, 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking).

DEMIR, I. E. et al. Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 28, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

DEMOLS, A. et al. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. **Pancreas**, v. 20, n. 2, p. 161-9, 2000. ISSN 0885-3177 (Print) 0885-3177 (Linking).

DICZFALUSY, M. A. et al. Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p. 1025-32, 2001. ISSN 0022-2275 (Print) 0022-2275 (Linking).

DIETRICH, F. et al. The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

DOSTERT, C. et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. 0006510, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

DOYLE, K. M. et al. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. **J Lipid Res**, v. 35, n. 3, p. 428-37, 1994. ISSN 0022-2275 (Print) 0022-2275 (Linking).

DUFOUR, M. C.; ADAMSON, M. D. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. **Pancreas**, v. 27, n. 4, p. 286-90, 2003. ISSN 1536-4828 (Electronic) 0885-3177 (Linking).

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 46, n. 3, p. 208-9, 1957.

FINK, G. W.; NORMAN, J. G. Intrapancreatic interleukin-1beta gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis. **J Surg Res**, v. 63, n. 1, p. 369-73, 1996. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking).

FROSSARD, J. L.; STEER, M. L.; PASTOR, C. M. Acute pancreatitis. **Lancet**, v. 371, n. 9607, p. 143-52, 2008. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

GADOTTI, V. M. et al. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 102, n. 4, p. 549-54, 2012. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking).

GAISANO, H. Y. et al. Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. **J Clin Invest**, v. 108, n. 11, p. 1597-611, 2001. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

GIAMBERARDINO, M. A. et al. Artificial ureteral calculosis in rats: behavioural characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 61, n. 3, p. 459-69, 1995. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking).

GOLDACRE, M. J.; ROBERTS, S. E. Hospital admission for acute pancreatitis in an English population, 1963-98: database study of incidence and mortality. **Bmj**, v. 328, n. 7454, p. 1466-9, 2004. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-535X (Linking).

GREWAL, H. P. et al. Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. **Surgery**, v. 115, n. 2, p. 213-21, 1994. ISSN 0039-6060 (Print) 0039-6060 (Linking).

GROEN, A.; LAGERWERF, A. J. Genic heterogeneity and genetic monitoring of mouse outbred stocks. **Lab Anim**, v. 13, n. 2, p. 81-5, 1979. ISSN 0023-6772 (Print) 0023-6772 (Linking).

GU, H. et al. Necro-inflammatory response of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. **Cell Death Dis**, v. 3, n. 4, p. 354, 2013. ISSN 2041-4889 (Electronic).

GUKOVSKY, I. et al. Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 2, p. 27-32, 2012. ISSN 1440-1746 (Electronic) 0815-9319 (Linking).

HAJJAR, N. A.; IANCU, C.; BODEA, R. Modern therapeutic approach of acute severe forms of pancreatitis. A review of the literature and experience of Surgical Department No III Cluj. **Chirurgia**, v. 107, n. 5, p. 605-10, 2012. ISSN 1221-9118 (Print) 1221-9118 (Linking).

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 857-65, 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking).

HALONEN, K. I. et al. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. **Crit Care Med**, v. 30, n. 6, p. 1274-9, 2002. ISSN 0090-3493 (Print)

0090-3493 (Linking).

HE, W. J. et al. Spinal P2X(7) receptor mediates microglia activation-induced neuropathic pain in the sciatic nerve injury rat model. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 1, p. 163-70, 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking).

HENTZE, H. et al. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 9, p. 956-68, 2003. ISSN 1350-9047 (Print)
1350-9047 (Linking).

HIRANO, T.; MANABE, T. Effect of ethanol on pancreatic lysosomes in rats: a possible mechanism for alcoholic pancreatitis. **Nihon Geka Hokan**, v. 62, n. 1, p. 16-23, 1993. ISSN 0003-9152 (Print)
0003-9152 (Linking).

HOEBERTZ, A.; ARNETT, T. R.; BURNSTOCK, G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 6, p. 290-7, 2003. ISSN 0165-6147 (Print)
0165-6147 (Linking).

HOFMEYR, S.; MEYER, C.; WARREN, B. L. Serum lipase should be the laboratory test of choice for suspected acute pancreatitis. **S Afr J Surg**, v. 52, n. 3, p. 72-5, 2014. ISSN 0038-2361 (Print)
0038-2361 (Linking).

HOQUE, R. et al. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 41, n. 3, p. 353-7, 2012. ISSN 1536-4828 (Electronic)
0885-3177 (Linking).

HOQUE, R.; MEHAL, W. Z. Inflammasomes in pancreatic physiology and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 308, n. 8, p. 19, 2015. ISSN 1522-1547 (Electronic)
0193-1857 (Linking).

HOQUE, R. et al. TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 358-69, 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic)
0016-5085 (Linking).

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 847-56, 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking).

HUANG, W. et al. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca²⁺-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. **Gut**, v. 63, n. 8, p. 1313-24, 2014. ISSN 1468-3288 (Electronic)

0017-5749 (Linking).

IYER, S. S. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20388-93, 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking).

JANIÁK, A. et al. Interleukin 18 as an early marker or prognostic factor in acute pancreatitis. **Prz Gastroenterol**, v. 10, n. 4, p. 203-7, 2015. ISSN 1895-5770 (Print)
1895-5770 (Linking).

JANISCH, N. H.; GARDNER, T. B. Advances in Management of Acute Pancreatitis. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 2016. ISSN 1558-1942 (Electronic)
0889-8553 (Linking).

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking).

JURIK, A. et al. Roles of prefrontal cortex and paraventricular thalamus in affective and mechanical components of visceral nociception. **Pain**, v. 156, n. 12, p. 2479-91, 2015. ISSN 1872-6623 (Electronic)
0304-3959 (Linking).

KAMATH, M. G. et al. 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**, v. 15, n. 2, p. 209-15, 2016. ISSN 1499-3872 (Print).

KANDEL, E. **Principles of Neural Science, Fifth Edition**. McGraw-Hill Education, 2013. ISBN 9780071390118. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=s64z-LdAlsEC> >.

KHAKH, B. S. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 165-74, 2001. ISSN 1471-003X (Print)
1471-003X (Linking).

KIM, E. H. et al. Activation of nociceptive neurons in T9 and T10 in cerulein pancreatitis. **J Surg Res**, v. 117, n. 2, p. 195-201, 2004. ISSN 0022-4804 (Print)
0022-4804 (Linking).

KIZILER, A. R. et al. Relationships among iron, protein oxidation and lipid peroxidation levels in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. **Biol Trace Elem Res**, v. 124, n. 2, p. 135-43, 2008. ISSN 0163-4984 (Print)
0163-4984 (Linking).

KLOPPEL, G.; MAILLET, B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. **Pancreas**, v. 8, n. 6, p. 659-70, 1993. ISSN 0885-3177 (Print)
0885-3177 (Linking).

KRAYCHETE, D. C.; GUIMARAES, A. C. [Visceral hyperalgesia and chronic abdominal pain: diagnostic and therapeutic approach.]. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 53, n. 6, p. 833-53, 2003. ISSN 1806-907X (Electronic) 0034-7094 (Linking).

KUMMER, J. A. et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. **J Histochem Cytochem**, v. 55, n. 5, p. 443-52, 2007. ISSN 0022-1554 (Print) 0022-1554 (Linking).

KURASHIMA, Y. et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. **Nat Commun**, v. 3, n. 1034, 2012. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking).

LAIRD, J. M. et al. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, v. 92, n. 3, p. 335-42, 2001. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking).

LAPOSATA, E. A.; LANGE, L. G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. **Science**, v. 231, n. 4737, p. 497-9, 1986. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

LEE, J. H. et al. Prevention effects of ND-07, a novel drug candidate with a potent antioxidative action and anti-inflammatory action, in animal models of severe acute pancreatitis. **Eur J Pharmacol**, v. 687, n. 1-3, p. 28-38, 2012. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking).

LIDBERG, U. et al. Genomic organization, sequence analysis, and chromosomal localization of the human carboxyl ester lipase (CEL) gene and a CEL-like (CELL) gene. **Genomics**, v. 13, n. 3, p. 630-40, 1992. ISSN 0888-7543 (Print) 0888-7543 (Linking).

LINDSAY, T. H. et al. Pancreatic cancer pain and its correlation with changes in tumor vasculature, macrophage infiltration, neuronal innervation, body weight and disease progression. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 233-46, 2005. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking).

LIU, N. J. et al. Phospholipase A2 as a point of care alternative to serum amylase and pancreatic lipase. **Nanoscale**, v. 8, n. 23, p. 11834-9, 2016. ISSN 2040-3372 (Electronic) 2040-3364 (Linking).

LIU, P. Y. et al. P2X7 Receptor Mediates Spinal Microglia Activation of Visceral Hyperalgesia in a Rat Model of Chronic Pancreatitis. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 1, n. 6, p. 710-720, 2015. ISSN 2352-345X (Linking).

LIU, X. J.; SALTER, M. W. Purines and pain mechanisms: recent developments. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 6, n. 1, p. 65-75, 2005. ISSN 1472-4472 (Print) 1472-4472 (Linking).

LOPEZ-FONT, I. et al. Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 27, p. 3411-7, 2010. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327 (Linking).

MALLEO, G. et al. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis--lessons from experimental models. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 431-48, 2007. ISSN 1537-744X (Electronic) 1537-744X (Linking).

MANOHAR, M. et al. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**, v. 8, n. 1, p. 10-25, 2017. ISSN 2150-5349 (Linking).

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, 2002. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking).

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking).

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 1, p. 10-22, 2007. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047 (Linking).

MARTUCCI, C. et al. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. **Pain**, v. 137, n. 1, p. 81-95, 2008. ISSN 1872-6623 (Electronic) 0304-3959 (Linking).

MATCHETT, J. A.; ERICKSON, C. K. Alteration of ethanol-induced changes in locomotor activity by adrenergic blockers in mice. **Psychopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 201-6, 1977. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking).

MAYERLE, J.; SIMON, P.; LERCH, M. M. Medical treatment of acute pancreatitis. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 855-69, 2004. ISSN 0889-8553 (Print) 0889-8553 (Linking).

MELINO, G.; KNIGHT, R. A.; NICOTERA, P. **How many ways to die? How many different models of cell death?** *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12 Suppl 2:1457-62., 2005. ISBN 1350-9047 (Print)

1350-9047 (Linking).

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9, 1965. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking).

MEOTTI, F. C. et al. Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. **Eur J Pharmacol**, v. 567, n. 3, p. 198-205, 2007. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking).

MEYER-SIEGLER, K. L.; ORDORICA, R. C.; VERA, P. L. Macrophage migration inhibitory factor is upregulated in an endotoxin-induced model of bladder inflammation in rats. **J Interferon Cytokine Res**, v. 24, n. 1, p. 55-63, 2004. ISSN 1079-9907 (Print)
1079-9907 (Linking).

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999. ISSN 0301-0082 (Print)
0301-0082 (Linking).

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 4, p. 283-94, 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic)
1471-003X (Linking).

NAVINA, S. et al. Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 107, p. 3002573, 2011. ISSN 1946-6242 (Electronic)
1946-6234 (Linking).

NEARY, J. T.; ZIMMERMANN, H. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 189-98, 2009. ISSN 0166-2236 (Print)
0166-2236 (Linking).

NETO, O. A. **Dor: Princípios e prática**. Artmed Editora, 2009. ISBN 9788536317922. Disponível em: < https://books.google.com.mx/books?id=QgCJ_f_-htkC >.

NIEBERGALL-ROTH, E.; HARDER, H.; SINGER, M. V. A review: acute and chronic effects of ethanol and alcoholic beverages on the pancreatic exocrine secretion in vivo and in vitro. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 7, p. 1570-83, 1998. ISSN 0145-6008 (Print)
0145-6008 (Linking).

NORMAN, J. et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. **Surgery**, v. 117, n. 6, p. 648-55, 1995. ISSN 0039-6060 (Print)
0039-6060 (Linking).

NORMAN, J. G. et al. Active interleukin-1 receptor required for maximal progression of acute pancreatitis. **Ann Surg**, v. 223, n. 2, p. 163-9, 1996. ISSN 0003-4932 (Print)
0003-4932 (Linking).

NORMAN, J. G. et al. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. **Ann Surg**, v. 221, n. 6, p. 625-31, 1995. ISSN 0003-4932 (Print)
0003-4932 (Linking).

OGURA, Y.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 659-62, 2006. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking).

OWENS, C. W.; BELCHER, R. V. A Colorimetric Micro-Method for the Determination of Glutathione. **Biochem J**, v. 94, p. 705-11, 1965. ISSN 0264-6021 (Print)
0264-6021 (Linking).

PACHECO, R. C.; NISHIOKA, S. D. A.; OLIVEIRA, L. C. M. D. Validade da amilase e da lipase no diagnóstico diferencial entre pancreatite aguda/crônica agudizada e outras causas de dor abdominal aguda. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40, p. 233-238, 2003. ISSN 0004-2803. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032003000400007&nrm=iso>.

PAL, K. M. et al. Correlates of morbidity and mortality in severe necrotizing pancreatitis. **ISRN Surg**, v. 215193, n. 10, p. 9, 2012. ISSN 2090-5793 (Electronic)
2090-5785 (Linking).

PANDOL, S. J. **The Exocrine Pancreas**. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease, 2010.

PANDOL, S. J. et al. Acute pancreatitis: bench to the bedside. **Gastroenterology**, v. 132, n. 3, p. 1127-51, 2007. ISSN 0016-5085 (Print)
0016-5085 (Linking).

PANKRATOV, Y. et al. P2X receptors and synaptic plasticity. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 137-48, 2009. ISSN 0306-4522 (Print)
0306-4522 (Linking).

PARLESÁK, A. et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. **J Hepatol**, v. 32, n. 5, p. 742-7, 2000. ISSN 0168-8278 (Print)
0168-8278 (Linking).

PEREIRA, L. M. et al. Blockade of TRPA1 with HC-030031 attenuates visceral nociception by a mechanism independent of inflammatory resident cells, nitric oxide and the opioid system. **Eur J Pain**, v. 17, n. 2, p. 223-33, 2013. ISSN 1532-2149 (Electronic)

1090-3801 (Linking).

PEREJASLOV, A.; CHOOKLIN, S.; BIHALSKYY, I. Implication of interleukin 18 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in acute pancreatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 55, n. 86-87, p. 1806-13, 2008. ISSN 0172-6390 (Print)

0172-6390 (Linking).

PETRASEK, J. et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 10, p. 3476-89, 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking).

PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators Inflamm**, v. 672395, n. 10, p. 13, 2010. ISSN 1466-1861 (Electronic)

0962-9351 (Linking).

PINI, M. et al. Effect of diet-induced obesity on acute pancreatitis induced by administration of interleukin-12 plus interleukin-18 in mice. **Obesity**, v. 18, n. 3, p. 476-81, 2010. ISSN 1930-739X (Electronic)

1930-7381 (Linking).

POELCHEN, W. et al. Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 102, n. 3, p. 593-602, 2001. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking).

PORTELLI, M.; JONES, C. D. Severe acute pancreatitis: pathogenesis, diagnosis and surgical management. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 16, n. 2, p. 155-159, 2017. ISSN 1499-3872 (Print).

PORTO, C. C. **Exame clínico**. 12ª. Guanabara Koogan, 2012. ISBN 9788527709057. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=srN1PgAACAAJ> >.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413-92, 1998. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking).

RARATY, M. et al. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 24, p. 13126-31, 2000. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking).

RAU, B. et al. Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis. **Lab Invest**, v. 81, n. 7, p. 1001-13, 2001. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837 (Linking).

RIBEIRO, R. A. et al. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, n. 4, p. 472-7, 1991. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking).

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 387, n. 1, p. 111-8, 2000. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking).

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 123-33, 1998. ISSN 0066-4219 (Print) 0066-4219 (Linking).

SAH, R. P.; DAWRA, R. K.; SALUJA, A. K. New insights into the pathogenesis of pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 29, n. 5, p. 523-30, 2013. ISSN 1531-7056 (Electronic) 0267-1379 (Linking).

SALMINEN, A. et al. Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 6A, p. 2255-62, 2008. ISSN 1582-1838 (Print) 1582-1838 (Linking).

SARI, R. et al. Ethanol inhibits the motility of rabbit sphincter of Oddi in vitro. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 23, p. 3470-4, 2004. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327 (Linking).

SCHAFER, C.; TIETZ, A. B.; GOKE, B. Pathophysiology of acute experimental pancreatitis: lessons from genetically engineered animal models and new molecular approaches. **Digestion**, v. 71, n. 3, p. 162-72, 2005. ISSN 0012-2823 (Print) 0012-2823 (Linking).

SCHNEIDER, A.; WHITCOMB, D. C.; SINGER, M. V. Animal models in alcoholic pancreatitis--what can we learn? **Pancreatology**, v. 2, n. 3, p. 189-203, 2002. ISSN 1424-3903 (Print) 1424-3903 (Linking).

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1361-8, 2007. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking).

SHI, F. et al. The NALP3 inflammasome is involved in neurotoxic prion peptide-induced microglial activation. **J Neuroinflammation**, v. 9, n. 73, p. 1742-2094, 2012. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking).

SIKANDAR, S.; DICKENSON, A. H. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 6, n. 1, p. 17-26, 2012. ISSN 1751-4266 (Electronic) 1751-4258 (Linking).

SKIPWORTH, J. R.; SHANKAR, A.; PEREIRA, S. P. Managing acute and chronic pancreatitis. **Practitioner**, v. 254, n. 1733, p. 23-7, 2010. ISSN 0032-6518 (Print) 0032-6518 (Linking).

SNIDER, W. D.; MCMAHON, S. B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 629-32, 1998. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking).

SOUZA, G. E. et al. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377-80, 1988. ISSN 0065-4299 (Print) 0065-4299 (Linking).

SUTTERWALA, F. S. et al. NALP3: a key player in caspase-1 activation. **J Endotoxin Res**, v. 12, n. 4, p. 251-6, 2006. ISSN 0968-0519 (Print) 0968-0519 (Linking).

SZABO, G. et al. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, n. 2-3, p. 115-23, 2007. ISSN 1424-3903 (Print) 1424-3903 (Linking).

TANAKA, N. et al. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. **Crit Care Med**, v. 23, n. 5, p. 901-8, 1995. ISSN 0090-3493 (Print) 0090-3493 (Linking).

TATTERSALL, S. J.; APTE, M. V.; WILSON, J. S. A fire inside: current concepts in chronic pancreatitis. **Intern Med J**, v. 38, n. 7, p. 592-8, 2008. ISSN 1445-5994 (Electronic) 1444-0903 (Linking).

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. **NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?** Nat Rev Immunol. 2010 Mar;10(3):210-5. doi: 10.1038/nri2725. Epub 2010 Feb 19., 2010. ISBN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking).

UEDA, T. et al. Significant elevation of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis. **J Gastroenterol**, v. 41, n. 2, p. 158-65, 2006. ISSN 0944-1174 (Print) 0944-1174 (Linking).

UHL, W. et al. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. **Pancreatology**, v. 2, n. 6, p. 565-73, 2002. ISSN 1424-3903 (Print) 1424-3903 (Linking).

URBAN, M. O.; GEBHART, G. F. Central mechanisms in pain. **Med Clin North Am**, v. 83, n. 3, p. 585-96, 1999. ISSN 0025-7125 (Print) 0025-7125 (Linking).

VONLAUFEN, A. et al. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 5, n. 2, p. 82-90, 2014. ISSN 2150-5330 (Linking).

WADE, C. M.; DALY, M. J. Genetic variation in laboratory mice. **Nat Genet**, v. 37, n. 11, p. 1175-80, 2005. ISSN 1061-4036 (Print)
1061-4036 (Linking).

WANG, S. et al. Adrenergic signaling mediates mechanical hyperalgesia through activation of P2X3 receptors in primary sensory neurons of rats with chronic pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 308, n. 8, p. 29, 2015. ISSN 1522-1547 (Electronic)
0193-1857 (Linking).

WANG, Y. et al. Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells. **Gut**, v. 58, n. 3, p. 422-30, 2009. ISSN 1468-3288 (Electronic)
0017-5749 (Linking).

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. **Sci Signal**, v. 3, n. 105, 2010. ISSN 1937-9145 (Electronic)
1945-0877 (Linking).

WEN, H.; TING, J. P.; O'NEILL, L. A. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 352-7, 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking).

WERESZCZYNSKA-SIEMIATKOWSKA, U. et al. The importance of interleukin 18, glutathione peroxidase, and selenium concentration changes in acute pancreatitis. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 4, p. 642-50, 2004. ISSN 0163-2116 (Print)
0163-2116 (Linking).

WERESZCZYNSKA, S. et al. Oxidative stress as an early prognostic factor in acute pancreatitis (AP): its correlation with serum phospholipase A2 (PLA2) and plasma polymorphonuclear elastase (PMN-E) in different-severity forms of human AP. **Pancreas**, v. 17, n. 2, p. 163-8, 1998. ISSN 0885-3177 (Print)
0885-3177 (Linking).

WERNER, J. et al. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. **Gastroenterology**, v. 113, n. 1, p. 286-94, 1997. ISSN 0016-5085 (Print)
0016-5085 (Linking).

WERNER, J. et al. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, n. 1, p. G65-73, 2002. ISSN 0193-1857 (Print)
0193-1857 (Linking).

WESSELMANN, U. et al. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: behavioral characterization in the rat. **Neurosci Lett**, v. 246, n. 2, p. 73-6, 1998. ISSN 0304-3940 (Print)
0304-3940 (Linking).

WHITE, F. A.; JONES, K. J. IL-1beta signaling initiates inflammatory hypernociception. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 7, p. 1014-5, 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic)
0889-1591 (Linking).

WILDI, S. et al. Suppression of transforming growth factor beta signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. **Gut**, v. 56, n. 5, p. 685-92, 2007. ISSN 0017-5749 (Print)
0017-5749 (Linking).

WINK, M. R. et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. **Neuroscience**, v. 138, n. 2, p. 421-32, 2006. ISSN 0306-4522 (Print)
0306-4522 (Linking).

WINSTON, J. H. et al. Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p. 214-22, 2005. ISSN 0304-3959 (Print)
0304-3959 (Linking).

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3 Suppl, p. 18, 2011. ISSN 1872-6623 (Electronic)
0304-3959 (Linking).

XU, X. D. et al. Acute Pancreatitis Classifications: Basis and Key Goals. **Medicine**, v. 94, n. 48, p. 0000000000002182, 2015. ISSN 1536-5964 (Electronic)
0025-7974 (Linking).

YADAV, D.; AGARWAL, N.; PITCHUMONI, C. S. A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 6, p. 1309-18, 2002. ISSN 0002-9270 (Print)
0002-9270 (Linking).

YADAV, D.; LOWENFELS, A. B. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1252-61, 2013. ISSN 1528-0012 (Electronic)
0016-5085 (Linking).

YADAV, D.; PITCHUMONI, C. S. Issues in hyperlipidemic pancreatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 36, n. 1, p. 54-62, 2003. ISSN 0192-0790 (Print)
0192-0790 (Linking).

YANG, Y. Z. et al. Clinical significance of dynamic detection for serum levels of MCP-1, TNF-alpha and IL-8 in patients with acute pancreatitis. **Asian Pac J Trop Med**, v. 9, n. 11, p. 1111-1114, 2016. ISSN 2352-4146 (Electronic).

YANG, Z. W.; MENG, X. X.; XU, P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. **J Cell Mol Med**, v. 19, n. 11, p. 2513-20, 2015. ISSN 1582-4934 (Electronic)
1582-1838 (Linking).

YAZDI, A. S. et al. Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation. **J Innate Immun**, v. 2, n. 3, p. 228-37, 2010. ISSN 1662-8128 (Electronic)
1662-811X (Linking).

YING, Y. L. et al. Over-expression of P2X7 receptors in spinal glial cells contributes to the development of chronic postsurgical pain induced by skin/muscle incision and retraction (SMIR) in rats. **Exp Neurol**, v. 261, p. 836-43, 2014. ISSN 1090-2430 (Electronic)
0014-4886 (Linking).

YOKOYAMA, H. et al. Effects of herpes simplex virus vector-mediated enkephalin gene therapy on bladder overactivity and nociception. **Hum Gene Ther**, v. 24, n. 2, p. 170-80, 2013. ISSN 1557-7422 (Electronic)
1043-0342 (Linking).

YU, J. H.; KIM, H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 46, p. 17324-9, 2014. ISSN 2219-2840 (Electronic)
1007-9327 (Linking).

ZHANG, X. P.; LI, Z. J.; ZHANG, J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 8, n. 4, p. 351-7, 2009. ISSN 1499-3872 (Print).



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 94/2013, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO VISCERAL NA PANCREATITE ALCOÓLICA AGUDA E CRÔNICA E INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 19 de dezembro de 2013.

Fortaleza, 20 de dezembro de 2013

Assinatura manuscrita em azul da Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



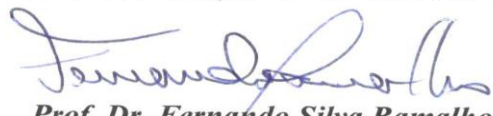
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Avaliação do papel do inflamassoma nplr 3 na hipernocicepção visceral em modelo de pancreatite aguda alcoólica em camundongos*”, registrado com o número **182/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 28 de novembro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 108 camundongos C57BL/6 machos pesando 20g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; e 90 camundongos transgênicos machos (linhagens Caspase-1 KO, Nalp-3 KO, IL-1R KO, ASC KO, IL-18 KO) pesando 20g, oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 28/11/2016 a 30/06/2017.

We certify that the Protocol nº 182/2016, entitled “*Evaluation of Role of NPLR 3 inflamassome on the visceral hypernociception in the alcoholic acute pancreatitis in mice*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/28/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 108 male C57BL/6 mice weighing 20g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; and 90 male transgenic mice [strains Caspase-1 KO, Nalp-3 KO, IL-1R KO, ASC KO, IL-18 KO (C57BL/6)] weighing 20g, from the Special Mice Breeding Center of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 06/30/2017.

Ribeirão Preto, 28 de novembro de 2016


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
 Presidente da CEUA – FMRP – USP