



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

CECÍLIA MENDES MORAIS DE CARVALHO

**PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL GRAVE CURSA COM DISFUNÇÃO
PULMONAR, ENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS E DANO DIAFRAGMÁTICO**

FORTALEZA-CEARÁ

2018

CECÍLIA MENDES MORAIS DE CARVALHO

PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL GRAVE CURSA COM DISFUNÇÃO
PULMONAR, ENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS E DANO DIAFRAGMÁTICO

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.

FORTALEZA-CEARÁ

2018

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)

- C322p Carvalho, Cecília Mende Morais de.
PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL GRAVE CURSA COM DISFUNÇÃO
PULMONAR COM ENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS E DANO DIAFRAGMÁTICO /
Cecília Mende Morais de Carvalho. – 2018.
106 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
1. Pancreatite Aguda. 2. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. 3. Macrófagos. 4.
Função pulmonar. I. Título.

CDD 615.1

CECÍLIA MENDES MORAIS DE CARVALHO

PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL GRAVE CURSA COM DISFUNÇÃO
PULMONAR, ENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS E DANO DIAFRAGMÁTICO

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.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Remo de Castro Russo
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. Marcelo Alcântara Holanda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus, Soberano Pai, Jesus Cristo, Senhor e Salvador da minha vida. Ao meu esposo, Valdir Junior, meus pais Gildenir e Lucimar, ao meu irmão Davi, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tanto amor, cuidado, misericórdia e graça, que me sustentou durante toda a jornada de realização desse sonho.

Ao meu esposo **Valdir Carvalho**, pelas orações, pelo companheirismo, incentivo, paciência, compreensão nos momentos em que estive ausente, pela ajuda de forma prática, muitas vezes indo ao laboratório comigo aos domingos ou me esperando até tarde da noite. Conseguimos meu amor!

Aos meus pais, **Gildenir e Lucimar**, pelo amor e apoio incondicional, dedicação, pela intercessão diante do SENHOR por mim, porque se realizam com a minha felicidade. Aos meus sogros, **Valdir e Luiza**, por estarem sempre dispostos a me ajudar, e pelas orações.

Ao Professor Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares**, meu orientador, por ter me acolhido e confiado em mim; pela orientação científica e pessoal, pela dedicação e principalmente pela paciência.

Ao professor Dr. **Remo de Castro Russo**, da UFMG, pela colaboração, por ter aberto as portas do Laboratório de Imunologia e Mecânica (LIMP) Pulmonar e disponibilizado toda estrutura necessária para a realização dos experimentos.

Ao professor Dr. **Diego Wilke** pela colaboração, pela acolhida, empolgação e ajuda na realização dos experimentos que envolveram citometria de fluxo.

Ao professor **Ricardo de Freitas Lima**, pelo apoio científico e ajuda no período em que estive na UFMG.

A todos os outros professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que contribuíram de alguma forma para a minha formação no doutorado.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação do laboratório LEFFAG: **Tiago Mendes, Marcos Aurélio, Álvaro Xavier, Carlos, Thiago**

Menezes; Agradecimento todo especial ao grupo das Lulus do LEFFAG: **Deys Pri, Fabrícia, Samara, Bárbara**. A minha amiga **Camila Fernandes**, por ter me ajudado na busca incansável pelos macrófagos! Vocês são bênçãos do SENHOR em minha vida e deixaram esta caminhada menos árdua! Sem ajuda de vocês, jamais teria chegado até aqui.

A minha grande amiga **Kaira Emanuella**, companheira de todas as horas pelas conversas, pessoais e profissionais e pela grande amizade que o SENHOR fez nascer em nossos corações; comemorando juntas os momentos alegres e chorando juntas nos momentos difíceis. Verdadeiramente, existem amigos mais chegados do que irmãos. Pv 18:24.

Aos estudantes de iniciação científica do LEFFAG, em especial, **Athayde Moraes, João Victor, Victinho, Wania, Jean, Juan**; não chegaria até aqui sem a contribuição de vocês.

Ao funcionário **José Amadeus Souza**, pela disponibilidade e prontidão em ajudar, pelo esforço e suporte para que todos os experimentos dessem certo.

As minhas amigas e irmãs **Alyne Teixeira, Dilma Lima, Silmara Rocha, Najla Angeline**, pois sei que torcem e oram por mim, se alegram com as minhas vitórias e estão dispostas a me ajudar a qualquer momento. Não importa a distância ou quanto tempo passamos sem nos falar, a amizade nunca muda.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro

A unidade multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pelo apoio técnico oferecido.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram em alguma etapa da execução do meu trabalho.

“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu um Deus além de ti que trabalha para aquele que nele espera”.

Isaías 64:4.

RESUMO

PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL GRAVE CURSA COM DISFUNÇÃO PULMONAR, ENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS E DANO DIAFRAGMÁTICO

Introdução: A pancreatite aguda (PA) é considerada uma situação de emergência abdominal, que pode progredir para uma resposta inflamatória sistêmica e Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos, sendo o pulmão o órgão mais afetado e principal responsável pelas mortes nos indivíduos com PA. Na disfunção pulmonar, os macrófagos alveolares podem orquestrar tanto a iniciação como a resolução dessa inflamação. O diafragma, por ser o principal músculo da respiração, deve ser avaliado em casos de disfunção da mecânica pulmonar. **Objetivos:** Avaliar as repercussões funcionais e inflamatórias pulmonares, explorando as principais células envolvidas, no curso da pancreatite aguda alcoólica e biliar experimental. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Swiss e C57BL/6, machos (25-30 g). Para indução de PA biliar, os animais foram anestesiados, submetidos a uma laparotomia mediana, para canulação do ducto pancreático e receberam infusão de 50 µL de solução salina (0,9%) ou ácido taurolitocólico (TLC-S 3%). Para indução de PA alcoólica, os animais receberam administrações intraperitoneais de salina (250µl), etanol (1,35 g/Kg), ou etanol associado ao ácido palmitoléico (POA), 150 mg/Kg (2x, em intervalo de 1 h). Após 24 h da indução da PA, os animais foram anestesiados, foram coletados lavado bronco-alveolar (LBA) e sangue, em seguida foram eutanasiados e amostras pâncreas e pulmão foram coletadas. Realizou-se as seguintes análises: dosagem de amilase e lipase plasmática, alterações inflamatórias do pâncreas e pulmão (análise histopatológica, atividade de Mieloperoxidase-MPO e dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β), investigação das respostas funcionais pulmonares (espirometria, mecânica pulmonar e contratilidade diafragmática) e estudo do papel do macrófago alveolar por citometria de fluxo e cultura macrofágica. Foram realizadas ainda as dosagens de nitrito, proteínas totais e de citocinas (TNF- α e IL-1 β e IL-10) do LBA. **Resultados:** Níveis séricos de amilase, lipase, citocinas (TNF- α e IL-1 β) e atividade de MPO pancreática e pulmonar estavam aumentados nos animais com PA; houve danos ao tecido pancreático e pulmonar, nos animais com PA, quando comparados ao grupo

controle. Foram observadas alterações nos parâmetros de mecânica pulmonar e espirometria: Fluxo, Volume Corrente, Volume Minuto, Capacidade Residual Funcional, Capacidade Pulmonar Total, Volume Residual, Complacência Dinâmica, Complacência Quasi-Estática e Capacidade Inspiratória nos animais com PA quando comparados aos animais controle. Houve disfunção na contratilidade diafragmática caracterizada pela diminuição da taxa de contração e aumento da fatigabilidade. No LBA foi encontrada maior quantidade de macrófagos, de proteínas totais e de NO, nos animais com PA. Na cultura de macrófagos derivados do LBA, foi observado aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β . No ensaio de citometria de fluxo foi observado uma diminuição da marcação para o anticorpo CD206 nos animais com PA, quando comparado aos animais controles, sugerindo uma mudança de perfil fenotípico de M2 pra M1, nos macrófagos alveolares dos animais com PA. **Conclusão:** PA grave experimental cursa com lesão pulmonar aguda, com envolvimento de macrófagos alveolares, disfunção da mecânica pulmonar e dano diafragmático.

Palavras-chave: Pancreatite Aguda. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Macrófagos. Função pulmonar.

SEVERE ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS CAUSES LUNG DYSFUNCTION WITH MACROPHAGES INVOLVEMENT AND DIAPHRAGMATIC DAMAGE.

Introduction: Acute pancreatitis (AP) is considered an emergency abdominal situation. In the severe form of the disease, patients develop marked systemic inflammatory response and Multiple Organ Dysfunction Syndrome. Lungs are the main affected organs, being responsible for deaths in individuals with AP for the development of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Alveolar macrophages can orchestrate both initiation and resolution of this inflammation. The diaphragm, as the main muscle of breathing, should be evaluated in cases of pulmonary mechanical dysfunction. **Objectives:** To evaluate the functional and inflammatory pulmonary repercussions in the course of acute alcoholic and experimental biliary pancreatitis, exploring the main cells involved. **Methods:** Swiss and C57BL / 6 male mice (25-30 g) were used. For induction of biliary AP, the animals were anesthetized, submitted to a median laparotomy for cannulation of the pancreatic duct and received infusion of 50 μ L of saline solution (0.9%) or TLC-S (3%). For the induction of alcoholic AP, the animals received intraperitoneal administrations of saline (250 μ l), ethanol (1.35 g / kg) or ethanol associated with palmitolic acid (POA), 150 mg / kg (twice, with an hour interval) . After 24 h of AP induction, the animals were anesthetized to collect bronchoalveolar lavage (BAL) and blood samples, then euthanized and pancreas and lung samples were collected. We performed the following analysis: amylase and lipase plasma dosage; inflammatory changes of the pancreas and lung (histopathological evaluation; Mieloperoxidase - MPO activity; TNF- α and IL-1 β dosage); investigation of pulmonary functional responses (spirometry, pulmonary mechanics and diaphragmatic contractility). In addition, we studied the role of alveolar macrophage by flow cytometry (using labeling for CD206 antibody) and macrophage culture. Nitrite, total protein and cytokine (TNF- α , IL-1 β and IL-10) concentrations in BAL were also performed. **Results:** Serum levels of amylase, lipase, cytokines (TNF- α , IL-1 β), pancreatic and pulmonary MPO activity were increased in animals with AP; there was damage to the pancreatic and pulmonary tissue, revealed in the histopathological evaluation of the animals with AP when compared to the control group. Comparing the animals with AP to control animals, there was deterioration in pulmonary mechanics and

spirometry, which was measured by the following parameters: Flow, Tidal Volume, Minute Volume, Functional Residual Capacity, Total Pulmonary Capacity, Residual Volume, Dynamic Complacency, Quasi-Static Complacency and Inspiratory Capacity. There was dysfunction in diaphragmatic contractility characterized by decreased contraction rate and increased fatigability. In the BAL of the animals with PA, it was found a greater amount of cells (predominantly macrophages) and an increase in total proteins and nitric oxide. Culture of macrophages from BAL showed increased pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β . In the flow cytometric assay, a decrease in the labeling of the CD206 antibody was observed in the animals with PA when compared to the control animals, suggesting a phenotypic profile change from M2 to M1 in the alveolar macrophages of the animals with AP. **Conclusion:** Experimental severe AP presents with ALI, with involvement of alveolar macrophages, pulmonary mechanical dysfunction and diaphragmatic damage.

Key words: Acute pancreatitis. Acute Lung Injury. Macrophages. Pulmonary function.

Figura 1- Respostas das células acinares durante o desenvolvimento da PA.....	23
Figura 2- Representação esquemática do alvéolo normal e alvéolo lesionado na fase aguda de LPA e SDRA.....	29
Figura 3- Diferentes tipos de ativação de macrófagos, dependendo do microambiente.....	32
Figura 4- Esquema de indução de PA por TLC-S.....	41
Figura 5- Esquema de indução da PA por Etanol/POA.....	42
Figura 6- Esquema para determinação da contratilidade diafragmática.....	49
Figura 7- Níveis séricos de enzimas pancreáticas em modelo de PA biliar.....	51
Figura 8- Atividade de MPO em animais com PA biliar.....	53
Figura 9- Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA biliar.....	54
Figura 10- Análise histológica da lesão pulmonar em animais com PA biliar.....	55
Figura 11- Análise do lavado bronco-alveolar em modelo de PA biliar.....	56
Figura 12- Análise da função pulmonar em modelo de PA biliar.....	57
Figura 13- Atividade de amilase e lipase plasmática em animais com PA alcóolica.....	58
Figura 14- Avaliação da atividade de MPO em animais com PA alcóolica.....	59
Figura 15- Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA alcóolica.....	60
Figura 16- Análise histológica da lesão pulmonar na PA alcóolica.....	61
Figura 17- Avaliação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar em animais com PA alcóolica.....	62
Figura 18- Análise da função pulmonar em animais com PA alcóolica.....	63
Figura 19- Análise da contratilidade diafragmática dos com PA alcóolica.....	64
Figura 20- Análise do lavado bronco-alveolar em animais com PA alcóolica.....	66
Figura 21- Análise temporal do infiltrado celular do lavado bronco-alveolar.....	67
Figura 22- Análise das citocinas presente na cultura de macrófagos.....	68
Figura 23- Análise fenotípica dos macrófagos através de citometria de fluxo.....	70
Figura 24- Resumo esquemático da hipótese mecanística da LPA decorrente da	

PA..... 81

,

Tabela 1 - Escores histopatológicos pancreáticos de animais com PA biliar.....	59
Tabela 2 - Escores histopatológicos pulmonares de animais com PA biliar.....	60
Tabela 3 - Escores histopatológicos pancreáticos de animais com PA alcoólica..	60
Tabela 4 - Escores histopatológicos pulmonares de animais com PA alcoólica....	61

ANOVA	Análise de Variância
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Protein Assay</i>
BSA	Albumina Bovina Sérica
CChord	Complacência Quasi-Estática
CCK	Colecistocinina
CCL18	Ligando de quimiocina 18
Cdin	Complacência Dinâmica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cmH ₂ O	Centímetros de Água
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPT	Capacidade Pulmonar Total
CRF	Capacidade Residual Funcional
CXCL1	Quimiocina Ligante CXC 1
EEAG	Etil-estéres de ácidos graxos
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FR	Frequência respiratória
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
HTAB	Brometo de hexadecil-tri-metil-amônio
IFN- γ	Interferon γ
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IP	Intraperitoneal

LBA	Lavado bronco-alveolar
LEFFAG	Laboratório de Estudos da Fisiologia-Farmacologia Gastrointestinal
LIMP	Laboratório de Imunologia Pulmonar
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Macrófagos alveolares
MIF	Mediana de intensidade de fluorescência
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos-1 α
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
O ₂	Oxigênio molecular
PA	Pancreatite Aguda
PAMPs	Padrões moleculares relacionados aos patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina
PE	Polietileno
PMN	Polimorfonucleares
POA	Ácido palmitoléico
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões moleculares
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SDMO	Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SSC	<i>Side Scatter</i>
TC	Tomografia Computadorizada
TLC-S	Ácido taurolitocólico
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VC	Volume Corrente

VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VM	Volume Minuto
VR	Volume Residual
VT	Volume Total

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Pâncreas	21
1.2 Pancreatite Aguda (PA)	22
1.3 Lesão pulmonar decorrente da pancreatite aguda	24
1.3.1 Organização morfofuncional do sistema respiratório	26
1.3.2 Músculos da respiração	28
1.3.3 Propriedades mecânicas do pulmão, volumes e capacidades pulmonares	28
1.3.4 Síndrome do desconforto respiratório agudo	35
1.4 Papel dos macrófagos na lesão pulmonar decorrente da pancreatite aguda	35
1.5 Modelos de pancreatite aguda experimental e as contribuições do Laboratório de Físio-Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG)	38
1.5.1 Modelo de PA induzida por ácidos biliares	39
1.5.2 Modelo de PA alcoólica	40
1.5.3 Contribuições do Laboratório de Físio-Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG)	42
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Animais/Aspectos Éticos	46
4.2 Indução da PA biliar (TLC-S)	46
4.3 Indução da PA alcoólica	47
4.4 Alterações histopatológicas do pâncreas e pulmão	48
4.5 Avaliação das enzimas amilase e lipase	49
4.6 Alterações inflamatórias do pâncreas e pulmão	49
4.6.1 Atividade de MPO	49
4.6.2 Infiltrado de células no lavado bronco-alveolar	49
4.6.3 Dosagem de Nitrito	50
4.6.4 Dosagem de proteínas	50

4.7 Isolamento, cultivo e estudo dos macrófagos alveolares de macrófagos alveolares	51
4.7.1 Isolamento e purificação	51
4.7.2 Avaliação do envolvimento de citocinas	51
4.7.3 Estudo dos macrófagos por citometria de fluxo	52
4.8 Avaliação das respostas funcionais	53
4.8.1 Espirometria	53
4.8.2 Mecânica Pulmonar	53
4.8.3 Determinação da contratilidade diafragmática	54
4.9 Análise estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1 Análise da atividade de amilase e lipase plasmática na PA biliar	57
5.2 Análise da atividade de MPO pancreática e pulmonar	58
5.3 Análise histológica da lesão pancreática e pulmonar	58
5.4 Análise do Lavado bronco-alveolar (LBA)	61
5.5 Avaliação da função pulmonar	62
5.6 Análise da atividade de amilase e lipase na PA induzida alcoólica	64
5.7 Análise da atividade de MPO pancreática e pulmonar	64
5.8 Análise histológica da lesão pancreática e pulmonar	65
5.9 Análise dos níveis de citocinas no tecido pulmonar	67
5.10 Avaliação da função pulmonar	68
5.11 Avaliação da contratilidade diafragmática	70
5.12 Análise do lavado bronco-alveolar (LBA)	71
5.13 Análise temporal do infiltrado celular do LBA	73
5.14 Análise das citocinas presentes na cultura de MA derivados do LBA	75
5.15 Análise fenotípica dos MA através de Citometria de Fluxo	75
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas

O pâncreas é um órgão localizado entre o baço e o intestino e fica posterior ao estômago. Em humanos adultos mede entre 15 e 25 cm, pesa cerca de 100 gramas e possui função endócrina e exócrina (FISHER et al., 2010; PANDOL, 2011). O pâncreas endócrino consiste das ilhotas de Langerhans, responsáveis pela produção de insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, que atuam na manutenção da homeostasia da glicose no corpo (LEUNG; IP, 2006). O pâncreas exócrino consiste em uma rede de ramificação de ductos que saem para o intestino delgado. A função exócrina é executada por dois tipos de células, as células acinares e as do ducto pancreático. As células do ducto secretam fluido rico em bicarbonato; as células acinares são especializadas em sintetizar, armazenar e secretar enzimas digestivas. Em sua membrana basolateral existem receptores para hormônios e neurotransmissores que estimulam a secreção enzimática (LOW; SHUKLA; THORN, 2010; PANDOL, 2011).

As células acinares secretam amilase, proteases e lipases, enzimas responsáveis pelo processo de digestão de todos os três tipos de alimentos: carboidratos, proteínas e lipídeos. Estas células possuem retículo endoplasmático rugoso abundante para a síntese de proteínas e sua região apical contém grânulos de zimogênio (FISHER et al., 2010). Estes, após transporte intracelular, terão a liberação do seu conteúdo por meio de exocitose após fusão com a membrana apical da célula. Todo este processo pode ser regulado por meio de receptores para colecistocinina (CCK), acetilcolina (Ach), peptídeo liberador de gastrina (GRP), substância P (SP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e secretina, que se encontram na membrana basolateral da célula acinar. As substâncias ligadoras destes receptores promovem a secreção enzimática, com envolvimento das vias de sinalização de inositol trifosfato/diacilglicerol, que elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular, com subsequente desencadeamento da exocitose dependente de Ca^{2+} (CRIDDLE et al., 2009; PANDOL, 2011; WÄSLE; EDWARDSON, 2002).

De modo geral, a função fisiológica do pâncreas exócrino consiste na síntese e secreção de enzimas digestivas, como as proteases, para o intestino delgado com o objetivo de catalisar a hidrólise dos nutrientes presentes nos

alimentos. Em condições fisiológicas, o tripsinogênio e outras proteases pancreáticas permanecem em um estado inativo (zimogênios) durante sua síntese, transporte e armazenamento dentro da célula acinar e na secreção para o ducto pancreático. Após a entrada do suco pancreático no intestino delgado, o tripsinogênio é ativado por enteroquinases, convertido em tripsina, que processa proteoliticamente outros zimogênios pancreáticos (HALANGK; LERCH, 2005). Em condições normais, os zimogênios, que são precursores inativos das enzimas pancreáticas, são secretados a partir das células acinares e a ativação final dessas enzimas ocorre no intestino delgado (GAISANO; GORELICK, 2009). Entretanto, em situações em que a homeostasia das secreções pancreáticas é perdida, pode acontecer a ativação prematura das enzimas pancreáticas dentro das células acinares, o que potencialmente leva à autodigestão celular, característica presente na gênese do desenvolvimento da pancreatite aguda (PA). Os mecanismos pelos quais essa ativação prematura acontece, ainda são desconhecidos, mas alguns estudos apontam para o papel do cálcio nesse sistema (HUANG et al., 2014).

1.2 Pancreatite Aguda

A PA é considerada uma situação de emergência abdominal, cuja forma grave da doença apresenta complicações locais (necrose, abscesso ou pseudocisto) e/ou disfunção orgânica importante (BRADLEY, 1993). O mecanismo patogênico da doença ainda não é totalmente elucidado, contudo, sabe-se que ocorre uma desordem inflamatória do pâncreas exócrino caracterizada por edema pancreático, necrose acinar, hemorragia e necrose lipídica, inflamação e infiltração perivascular do pâncreas, podendo ainda atingir outros órgãos como fígado e pulmões (CRUZ-SANTAMARÍA; TAXONERA; GINER, 2012; SAH; GARG; SALUJA, 2012).

Doenças digestivas atingem cerca de 50 mil pessoas por ano no Reino Unido e ocorre em taxas similares em todo o mundo, sendo que 70% dos casos são de PA, causando grande morbidade e mortalidade. Nos EUA, a PA é a segunda causa de internação entre as doenças do trato gastrointestinal, sendo superada apenas pela colelitíase/colelístite (YADAV; LOWENFELS, 2013).

No Brasil a incidência varia geograficamente; no entanto, a média para cada 100.000 é de 19, segundo dados do Datasus e IBGE referentes a 2014. Entre os meses de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2017 foram registradas 30.032

internações, que resultaram em 1.551 óbitos no país, sendo a maior incidência na região sudeste. Esse quadro representa um custo de aproximadamente 26 milhões neste período (BRASIL, 2017).

A identificação do fator etiológico responsável pela PA é essencial, pois pode determinar o tratamento e sua eliminação pode levar a resolução do quadro ou a prevenção de um novo episódio (GUIMARÃES-FILHO et al., 2009). A causa mais comum de PA, responsável por cerca de 30 a 50 % dos casos é a obstrução biliar. O abuso de álcool destaca-se como a segunda causa, correspondendo a 36% dos casos em países desenvolvidos (WANG et al., 2009). Outras causas são: hereditariedade, hipertrigliceridemia, toxicidade medicamentosa, hipercalcemia, trauma abdominal, infecções, reações autoimunes e isquemias. Acredita-se que coagulação intravascular e o tromboembolismo possuem um importante papel na patogênese da PA e estão relacionados com a sua gravidade. Apenas 10% dos casos não tem fator etiológico bem definido e são considerados idiopáticos (FRANCO et al., 2009; HAGIWARA et al., 2009).

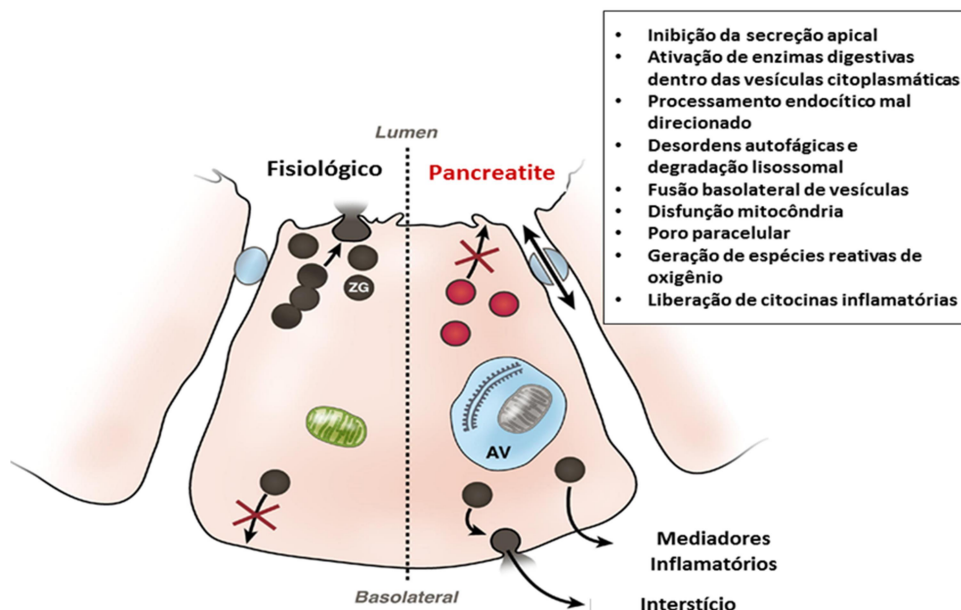
Clinicamente, a PA pode ser diagnosticada nos pacientes com duas ou três das seguintes características: início súbito de dor abdominal superior; níveis séricos de amilase e/ou lipase maiores do que três vezes o limite superior normal, achados na tomografia computadorizada e/ou ultra-sonografia abdominal com achados compatíveis de PA (BANKS et al., 2013). A dor geralmente tem irradiação dorsal e intensidade de moderada a forte, apresentando piora com alimentação ou uso de álcool. Em 90% dos casos é acompanhada de náuseas e vômitos. A hiperamilasemia é um marcador clássico da pancreatite aguda, apresenta alta sensibilidade, mas é pouco específica, já que em diversas situações como insuficiência renal, perfuração esofágica e gravidez, pode haver aumento de amilase sem a presença de pancreatite. Mesmo em pacientes com PA, a dosagem de amilase pode estar normal, por exemplo, no diagnóstico tardio, já que os níveis de amilase tendem a se normalizar após alguns dias de evolução. Já a dosagem de lipase sérica é considerada o exame laboratorial primário para o diagnóstico da pancreatite, uma vez que apresenta altas sensibilidade e especificidade e se mantém elevado por vários dias. Outros achados laboratoriais importantes são leucocitose e hiperglicemia moderada, como resultado da resposta inflamatória sistêmica. Pode-se observar também elevação discreta das transaminases hepáticas (GUIMARÃES-FILHO et al., 2009).

A determinação da gravidade da PA no momento do seu diagnóstico é fundamental no seu tratamento, já que permite a identificação precoce das complicações, a triagem de pacientes para tratamento em terapia intensiva e define as decisões terapêuticas. A base para o tratamento da PA é o suporte clínico e a suspensão da ingestão de alimentos, já que ainda não há tratamento específico para a doença. Este suporte clínico consiste na manutenção da perfusão tecidual, através da reposição volêmica vigorosa, manutenção da saturação de oxigênio, analgesia e suporte nutricional (GUIMARÃES-FILHO et al., 2009).

Apesar da patogênese da PA não ser totalmente compreendida, alguns mecanismos são bem conhecidos: autodigestão pancreática, distúrbios da microcirculação pancreática, ativação excessiva de leucócitos que leva a uma cascata de reações mediadas por citocinas e outros mediadores inflamatórios, além da translocação de bactérias do intestino para o tecido pancreático. Ativação intracinar prematura de enzimas digestivas é um evento-chave na patogênese da PA, sendo as principais enzimas envolvidas: a tripsina, a quimiotripsina, a elastase e a fosfolipase A, que são enzimas proteolíticas que escapam do grânulo do zimogênio, lesando a célula acinar pancreática (MELO et al., 2011; ZHANG; LI; ZHANG, 2009).

A fisiopatologia da PA, como citada anteriormente, se dá, inicialmente pela lesão das células acinares, de forma não regulada, pela conversão do tripsinogênio (pró-enzima) à sua forma ativa de tripsina. É sabido que em condições fisiológicas, os grânulos zimogênicos são concentrados nos polos apicais das células acinares, e há pouca ou nenhuma ativação intracelular das enzimas digestivas. Já nas fases iniciais da PA, a secreção apical é bloqueada, as proteases são ativadas dentro das células acinares e as enzimas digestivas podem acessar o espaço intersticial atravessando a barreira de junção interrompida ou saindo através da membrana basolateral. Essa ativação de proteases acontece quando se excede a capacidade dos inibidores de tripsina endógenos, ocorrendo, portanto a ativação de outros zimogênios dentro do pâncreas, o que leva à produção de uma cascata proteolítica que provoca autodigestão da glândula (**Figura 1**) (FROSSARD; STEER; PASTOR, 2008; STEER et al., 1996).

Figura 1 - Respostas das células acinares durante o desenvolvimento da pancreatite aguda. Círculo preto: ZG- zimogênios; círculo em azul: AV - vacúolo autofágico.



Fonte: Adaptado de (LERCH; GORELICK, 2013)

Outro evento importante é a liberação de mediadores inflamatórios pela célula acinar, substâncias vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular e contribuem para formação de edema. A resposta imediata dos mediadores inflamatórios, como citocinas e sistema complemento, estimula a migração de outras células inflamatórias, principalmente neutrófilos, que amplificam as alterações locais, aumentando o dano pancreático (MORETTI, 2007). Uma fase posterior envolve eventos extra-acinares, com lesão de outros órgãos. Nesta fase, os mediadores inflamatórios têm um papel importante na determinação da lesão pancreática e extrapancreática, em especial no pulmão (DE LA MANO et al., 2004; SEVILLANO et al., 2003).

Vários estudos experimentais, utilizando diversos modelos de indução de PA, têm sugerido que a PA é uma doença dividida em três fases. A fase inicial é caracterizada pela ativação de enzimas digestivas pancreáticas e lesão das células acinares, que envolve as primeiras horas da PA. Na segunda fase ocorre uma reação inflamatória intrapancreática e graus variáveis de necrose das células acinares, em torno de 12-72 horas após o insulto inicial. Na terceira fase, ocorre uma progressão da lesão do pâncreas e o aparecimento de alterações extrapancreáticas, tais como lesões hepática e pulmonar (BROWNE; PITCHUMONI, 2006).

Alguns modelos experimentais de PA foram desenvolvidos na tentativa de compreender sua fisiopatologia. Os modelos apresentam vantagens e desvantagens

e a seleção de um modelo irá depender do objetivo experimental (CHAN; LEUNG, 2007; PANDOL et al., 2007). Dentre estes, podemos citar aqueles induzidos por altas doses de L-arginina, pela administração de colecistocinina (CCK) ou de seu análogo ceruleína, por dieta deficiente em colina e suplementada com etionamida, pela perfusão/injeção no ducto pancreático de sais biliares, pela ligação do ducto biliopancreático ou por indução de alterações vasculares pancreáticas (CHAN; LEUNG, 2007; GRANGER; REMICK, 2005).

Zhao Liao e Nissen (2013) afirmam que existe uma deficiência de modelos experimentais de pancreatite que reproduzam a fisiopatologia da doença e por isso as terapias utilizadas ainda são limitadas, bem como a melhora do prognóstico para esta doença. Eles sugerem ainda que um modelo capaz de caracterizar os mediadores, os receptores, os canais iônicos, e os mecanismos associados à dor, difíceis de serem estudados em humanos, é necessário (ZHAO; LIAO; NISSEN, 2013). Além disso, esses modelos experimentais utilizam substâncias que não são capazes de reproduzir o que acontece na prática clínica, ou então, utilizam técnicas muito invasivas.

A maioria dos pacientes com PA sofre de uma doença leve e autolimitada, contudo 15-20% dos pacientes desenvolvem a forma grave da doença, com ocorrência da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO). A mortalidade durante as duas primeiras semanas da doença é geralmente devido à falência de múltiplos órgãos, após esse período é resultado de infecção secundária do pâncreas ou necrose peripancreática (ZAHEER et al., 2013).

Entre as principais complicações da SDMO decorrente de PA incluem-se: insuficiência cardíaca, falência renal, hepática e respiratória, sendo esta última a mais comum e potencialmente mais grave, devido ao desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (MUHS et al., 2003). PA associada à SDRA ocorre em 10 a 20% dos pacientes, sendo responsável por 60% das mortes (ELDER et al., 2012).

1.3 Lesão pulmonar decorrente da pancreatite aguda

1.3.1 Organização morfofuncional do sistema respiratório

O sistema respiratório dos mamíferos é composto e compreendido pela zona de transporte gasoso, formado pelas vias aéreas superiores e árvore traqueobrônquica, encarregadas de acondicionar e conduzir o ar até a intimidade dos pulmões; pela zona respiratória, onde efetivamente se realizam as trocas gasosas; e pela zona de transição, interposta entre as duas primeiras (AIRES, 2008).

A zona respiratória é constituída por ductos, sacos alveolares e alvéolos. A unidade alvéolo-capilar é o principal sítio de trocas gasosas a nível pulmonar. O alvéolo é a unidade fundamental de trocas gasosas; são estruturas hemisféricas com diâmetros que variam de 75 a 300 μm . Os aproximadamente 300 milhões de alvéolos tem uma área de superfície combinada de 50 a 100 m^2 e um volume máximo total de 5 a 6 L nos dois pulmões, quando somados. Os alvéolos são recobertos com uma substância de base predominantemente lipídica, chamada de surfactante, que reduz a tensão superficial. A tensão superficial é a força causada pelas moléculas de água na interface ar-líquido que tende a minimizar a área de superfície, tornando muito mais difícil insuflar o pulmão (AIRES, 2008).

O revestimento alveolar é formado por dois tipos de células, os pneumócitos do tipo I e do tipo II. As células cuboides do tipo II existem em grupos e são responsáveis por sintetizar o surfactante pulmonar, que é uma substância que facilita a expansão do pulmão. As células do tipo I são muito mais delgadas que as células do tipo II. Portanto, apesar de os dois tipos celulares estarem presentes em praticamente igual número, as células do tipo I cobrem 90 a 95% da superfície alveolar e representam a rota mais curta para a difusão de gases. Após uma lesão, células do tipo I se degeneram, ao passo que células do tipo II se proliferam e cobrem o espaço alveolar, reestabelecendo a continuidade da camada epitelial. Assim, células do tipo II parecem servir também como células de reparo (BORON, 2015).

Macrófagos alveolares constituem uma pequena porcentagem de células alveolares. Eles passam livremente da circulação para o espaço intersticial e, a seguir, passam pelos espaços entre células epiteliais e se localizam na superfície alveolar. Essas células têm função de fagocitar corpos estranhos, partículas poluentes e bactérias (BORON, 2015).

Já o espaço intersticial, ou interstício pulmonar, é composto de tecido conjuntivo, músculo liso, vasos linfáticos, capilares e muitas outras células. Sob condições normais o espaço intersticial é muito pequeno e, às vezes, não pode ser discernido por microscopia óptica, especialmente os compartimentos alveolares. No entanto, em condições patológicas ele pode ficar alargado com o influxo de células inflamatórias e fluido de edema, o que pode interferir na troca gasosa nos alvéolos (BERNE & LEVI, 2009).

1.3.2 Músculos da respiração

Os principais músculos da respiração incluem o diafragma, os intercostais externos e o escaleno, todos músculos esqueléticos. Os músculos esqueléticos produzem a força motriz para a ventilação; a força da contração aumenta quando eles são estirados e diminui quando eles se encurtam. A força da contração dos músculos respiratórios aumenta quando o pulmão está em seus maiores volumes (AIRES, 2008).

O mais importante músculo da respiração é o diafragma e também atua como um obstáculo à transmissão de pressão abdominal ao tórax. Durante a inspiração, a contração do diafragma traciona as superfícies inferiores dos pulmões para baixo. Em seguida, durante a expiração, o diafragma simplesmente relaxa e a retração elástica dos pulmões, da parede torácica e das estruturas abdominais comprimem os pulmões. Sua ação normalmente representa aproximadamente 70% do volume corrente inspirado. Por conta de seu papel crítico na ventilação, o diafragma é o único músculo esquelético que permanece continuamente contraindo, mesmo durante o sono. Devido à composição de suas fibras musculares, o diafragma é relativamente resistente à fadiga e se recupera mais rapidamente do que outros músculos esqueléticos. Disfunção diafragmática induzida por diversos fatores, inclusive sepse, frequentemente resulta em insuficiência respiratória, dificuldade para desmamar pacientes gravemente enfermos da ventilação mecânica e até alta mortalidade (JIANG et al., 2015).

1.3.3 Propriedades mecânicas do pulmão, volumes e capacidades pulmonares

A avaliação da função pulmonar e o estudo da mecânica do pulmão começam com a medida dos volumes pulmonares e dos fatores que determinam esses volumes. O volume total de todas as vias aéreas de um adulto (a nasofaringe, a traqueia e todas as demais vias aéreas até os sacos alveolares) é tipicamente de 5 a 6L. Os fisiologistas respiratórios definiram uma série de “volumes” e “capacidades” dos pulmões que, apesar de não corresponderem a um local anatômico em particular, são facilmente medidos com simples instrumentos laboratoriais e que propiciam informações úteis para avaliações clínicas (BERNE & LEVI, 2009).

O espirômetro é o aparelho que mede o volume de ar inspirado e expirado e assim a mudança de volume pulmonar. Os volumes pulmonares são convencionalmente divididos em quatro volumes primários e quatro capacidades:

Volume corrente- É a quantidade de ar inspirada ou expirada espontaneamente em cada ciclo respiratório.

Volume de reserva inspiratório- É o volume máximo que pode ser inspirado voluntariamente a partir do final de uma inspiração espontânea.

Volume de reserva expiratório- É o volume máximo que pode ser expirado voluntariamente a partir do final de uma expiração espontânea.

Volume residual- É o volume de gás que permanece no interior dos pulmões após a expiração máxima.

Capacidade vital- É a quantidade de gás mobilizada entre uma inspiração e uma expiração máximas.

Capacidade inspiratória- É o volume máximo inspirado a partir do final de uma expiração espontânea. Corresponde à soma dos volumes corrente e de reserva inspiratório.

Capacidade residual funcional- É a quantidade de gás contida nos pulmões no final de uma expiração espontânea. Corresponde à soma dos volumes de reserva expiratório e residual.

Capacidade pulmonar total- É a quantidade de gás contida nos pulmões ao final de uma inspiração máxima e equivale à adição dos quatro volumes primários (BORON, 2015).

Os volumes pulmonares são determinados pelo balanço entre as propriedades elásticas do pulmão e as propriedades dos músculos da caixa torácica.

O volume máximo de ar, contido no pulmão e na caixa torácica, é controlado pelos músculos da inspiração.

Já no âmbito da mecânica pulmonar - a física dos pulmões, das vias aéreas e da parede torácica - estuda-se como o corpo move o ar para dentro e para fora dos pulmões, produzindo uma mudança no volume pulmonar. Quando se examinam estas propriedades mecânicas na ausência de fluxo de ar, o que se estudam são propriedades estáticas. A situação torna-se mais complexa sob condições dinâmicas, quando os pulmões estão mudando de volume e o ar flui para dentro ou para fora (AIRES, 2008).

Complacência pulmonar é a medida das propriedades elásticas do pulmão. É a medida do quão facilmente o pulmão se distende. A complacência é definida como a mudança do volume pulmonar que resulta de mudança de 1 cm H₂O na pressão de distensão do pulmão. Complacência pulmonar elevada refere-se a pulmão prontamente distensível. A baixa complacência de um pulmão, ou pulmão "rígido", define o pulmão que não é facilmente distensível. Na prática clínica, aferem-se as complacências dinâmicas. Neste caso, o indivíduo respira espontaneamente e são registrados o volume mobilizado e a pressão correspondente. Como referido por Azeredo (2002) a complacência estática descreve uma atividade que ocorre durante a ventilação e quando o sistema pulmão/tórax não está em movimento; já a complacência dinâmica pode ser interpretada quando o tórax e os pulmões encontram-se em movimento (ÁULER JUNIOR et al. 1995).

Duas principais categorias de doenças pulmonares – restritiva e obstrutiva – podem reduzir severamente a ventilação total, ou seja, a quantidade de ar que entra e sai dos pulmões por unidade de tempo. A doença pulmonar restritiva em um sentido abrangente, pode se referir a qualquer enfermidade que reduza a capacidade residual funcional, a capacidade vital, ou a capacidade pulmonar total, dificultando, assim, o enchimento dos pulmões, ou seja, diminuindo a complacência pulmonar (BORON, 2015).

Doenças restritivas do parênquima pulmonar reduzem a complacência estática dos pulmões - primariamente uma propriedade dos alvéolos. Para superar a maior retração estática, o paciente precisa realizar esforço adicional para inalar. O paciente compensa este fato fazendo inspirações rápidas, mas pouco profundas. Um exemplo é a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). O edema

pulmonar é um acúmulo de líquido no interstício entre as paredes alveolares e capilares e, posteriormente, no espaço alveolar. Inflamações intersticiais por causas diversas (p. ex., infecções, drogas, exposição ambiental) podem levar à deposição de tecido fibroso e a um grupo de enfermidades chamadas coletivamente de fibrose pulmonar intersticial difusa (BORON, 2015).

1.3.4 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

O pulmão é o principal órgão responsável pelas mortes nos indivíduos com PA, devido ao desenvolvimento de SDRA. Cerca de 60% dos pacientes com PA desenvolvem complicações pulmonares, que podem variar desde uma leve hipoxemia até a SDRA e que são responsáveis por até 60% das mortes na primeira semana da doença (CHOOKLIN, 2009; MUHS et al., 2003).

A primeira descrição de SDRA ocorreu em 1967, quando Ashbaugh e colaboradores descreveram 12 pacientes com insuficiência respiratória aguda, hipoxemia refratária a oxigenoterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado pulmonar evidenciado na radiografia de tórax (Ashbaugh et al., 1967). Posteriormente, múltiplas definições foram propostas e utilizadas até a publicação da Conferência de Consenso Europeu-Americano (AECC) de 1994, que definiu SDRA como uma síndrome de insuficiência respiratória de instalação aguda, caracterizada por infiltrado pulmonar bilateral à radiografia de tórax, compatível com edema pulmonar; hipoxemia grave, definida como relação $\text{PaO}_2 / \text{FIO}_2 \leq 200$ mm Hg (pressão parcial de oxigênio pela fração de oxigênio inspirado); ausência de sinais clínicos ou ecocardiográficos de hipertensão atrial esquerda; presença de um fator de risco para lesão pulmonar. Além dessa definição de SDRA, foi criado o termo Lesão Pulmonar Aguda (LPA), cuja definição é idêntica à da SDRA, exceto pela menor gravidade de hipoxemia ($\text{PaO}_2 / \text{FIO}_2 \leq 300$ mm Hg) (Bernard et al., 1994). Já em 2012, o Consenso de Berlim passou a classificar SDRA como leve, moderada e grave, excluindo o termo LPA (Ranieri et al., 2012).

A SDRA ocorre como consequência de lesão alveolar por diversas causas, que podem ser de origem pulmonar (por exemplo, pneumonia, aspiração) ou não pulmonar (por exemplo, sepse, pancreatite, trauma), levando ao desenvolvimento de

edema pulmonar não hidrostático, produzindo dano alveolar difuso (RAWAL, YADAV, KUMAR, 2018).

Essas complicações pulmonares são caracterizadas por intenso processo inflamatório, causando dano alveolar difuso e resultando em um comprometimento variável da ventilação pulmonar, inadequada perfusão e hipoxemia grave. Os pacientes com SDRA frequentemente necessitam ser ventilados mecanicamente, o que aumenta ainda mais a morbidade e mortalidade (DUSHIANTHAN et al., 2011).

Os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da lesão pulmonar induzida por PA permanecem mal compreendidos (QIAO et al., 2016). Entretanto, estudos recentes indicam que a ativação de numerosas células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, levam à produção de citocinas e mediadores inflamatórios, que regulam tanto a gravidade da PA, como a lesão pulmonar decorrente da mesma (MERZA et al., 2015; YANG; MENG; XU, 2015).

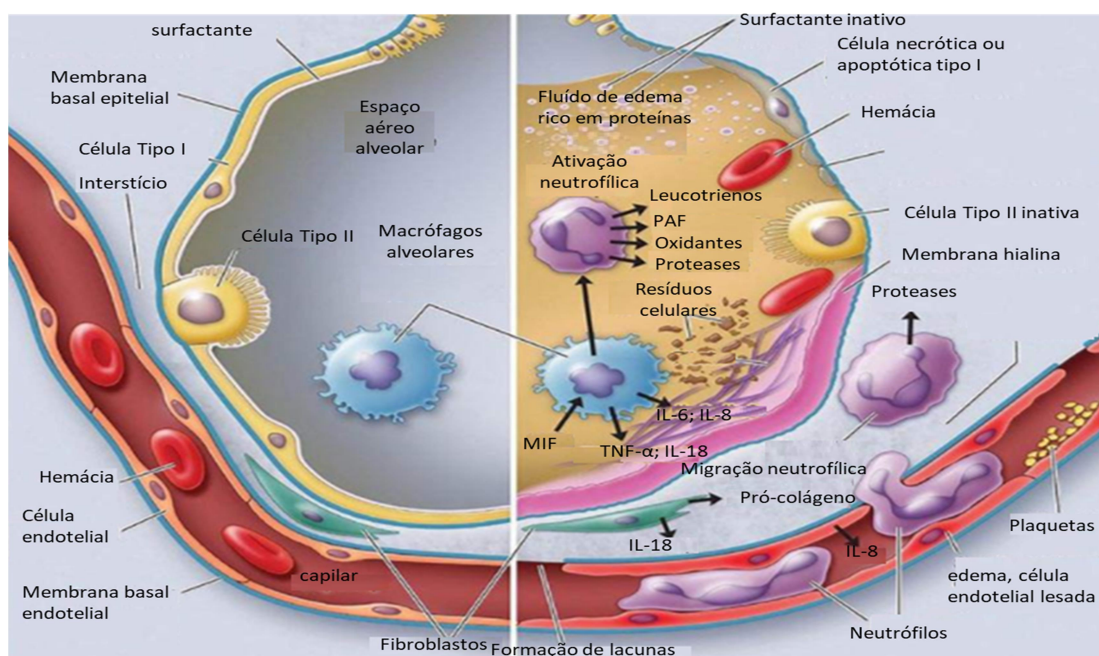
Na PA, os neutrófilos têm um papel central no início e disseminação do processo inflamatório para outros órgãos. Estas células constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro; porém, se houver uma ativação exacerbada, ocorrerão efeitos deletérios nos tecidos. Normalmente, o epitélio pulmonar é asséptico, formado apenas por macrófagos no interior dos espaços alveolares. Contudo, na lesão pulmonar, a principal característica é o infiltrado neutrofílico e o aumento da permeabilidade alvéolo-capilar. A infiltração neutrofílica é um evento precoce, secundário à liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, os neutrófilos liberam proteases, espécies reativas de oxigênio (ERO), que aumentam a lesão tecidual. Eles também liberam outras enzimas, como a ciclooxigenase e a lipoxigenase, que ao entrarem em contato com ácidos graxos livres promovem a liberação de prostaglandinas e leucotrienos, produzindo vasoconstrição e broncoconstrição (HARTWIG et al., 2002; ROCHA et al., 2007).

Duas fases distintas da SDRA têm sido descritas. Inicialmente uma fase exsudativa, durante os primeiros dias, com dano alveolar difuso, lesão microvascular, necrose de pneumócitos tipo II, afluxo de células inflamatórias e fluidos para o interstício pulmonar. Em seguida ocorre uma fase fibro-proliferativa nos 3 a 7 dias seguintes, caracterizada por hiperplasia dos pneumócitos, proliferação de fibroblastos e reparação pulmonar. Vários são os mediadores envolvidos, incluindo citocinas, quimiocinas e grande variedade de células que

regulam a migração e infiltração de neutrófilos para o tecido intersticial (ZHOU et al., 2010).

Entre as citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas envolvidas na progressão da SDRA destacam-se o TNF- α , MIP-1 (proteína inflamatória de macrófagos-1 α), IL-2, IL-6, IL-17, IL-18, que atraem neutrófilos e macrófagos para o pulmão; estes, quando ativados, juntamente com os macrófagos residentes, induzem uma cascata inflamatória. Essa cascata estimula ainda mais a quimiotaxia de neutrófilos e promove uma exacerbação da lesão pulmonar, com apoptose e necrose de células epiteliais. O dano epitelial promove aumento da permeabilidade da membrana alveolo-capilar, com consequente afluxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos, o que pode causar inativação do surfactante. Todo esse processo inflamatório induz alteração alveolar grave, com infiltrado exsudativo, colapso alveolar e queda da complacência pulmonar, prejudicando a troca de gases e levando a deterioração da função pulmonar (**Figura 2**) (ELDER et al., 2012; ROCHA et al., 2007).

Figura 2 - Representação esquemática do alvéolo normal (esquerda) e alvéolo lesionado na fase aguda de LPA e SDRA.



Fonte: Adaptado de KRESS, HALL, 2015.

O epitélio alveolar é formado por dois tipos de células morfológicamente diferentes, os pneumócitos tipo I e II. As células tipo I compreendem 95% do epitélio

alveolar, sendo o principal componente da barreira física contra patógenos respiratórios. As células do tipo II cobrem cerca de 3 a 5% da área da superfície alveolar e possuem funções imunomoduladoras, podendo produzir citocinas e quimiocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , como resposta a várias formas de lesão pulmonar, induzida por bactérias, vírus ou ventilação mecânica. Além disso, as células do tipo II são responsáveis por produzir, secretar e reciclar o surfactante (MATTHAY, ROBRICQUET, FANG, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que na lesão pulmonar decorrente da PA existe uma diminuição da produção de surfactante. O surfactante é uma mistura lipoproteica, com propriedades tensoativas, que reduz a tensão superficial entre o líquido presente na cavidade alveolar e o ar, aumentando, assim, a complacência pulmonar e evitando atelectasias. Portanto, a diminuição do surfactante pode ser importante causa da formação de atelectasia em regiões pulmonares dependentes, que pode ser uma das causas da disfunção pulmonar decorrentes da PA (BROWNE; PITCHUMONI, 2006).

SDRA se apresentam como um dos principais problemas clínicos decorrentes de PA, mas as pesquisas sobre esta área permanecem escassas. Embora vários estudos relatem as alterações inflamatórias do pulmão decorrentes da PA (GULTEKIN et al., 2007; MATSUDA et al., 2006) poucos têm como foco a funcionalidade do pulmão no curso desse processo inflamatório.

Um número limitado de modelos invasivos de PA tem sido utilizado para avaliar as mudanças na função pulmonar resultante da PA, através da mecânica pulmonar, que estuda as forças que movem os pulmões e a parede torácica, bem como as resistências que elas superam durante o ciclo respiratório, através da medição de parâmetros relativos a elasticidade e rigidez do pulmão (ELDER et al., 2011). As principais alterações da mecânica pulmonar na SDRA são: redução da complacência, decorrente do edema intersticial e alveolar, além do colapso alveolar, exigindo grandes pressões para abertura, durante a inspiração; aumento da resistência das vias aéreas, decorrente do acúmulo de líquido e espessamento das paredes das vias aéreas distais (PINHEIRO, OLIVEIRA, 2004).

A funcionalidade pulmonar também pode ser avaliada através da espirometria, que permite medir o volume de ar inspirado e expirado e os fluxos respiratórios. A espirometria é um exame que auxilia na prevenção e diagnóstico dos distúrbios ventilatórios e permite a quantificação dos mesmos. Deve, portanto, ser

parte integrante da avaliação de pacientes com sintomas respiratórios ou com doenças respiratórias já conhecidas (PEREIRA, 2002).

1.4 Papel dos macrófagos na lesão pulmonar decorrente da pancreatite aguda

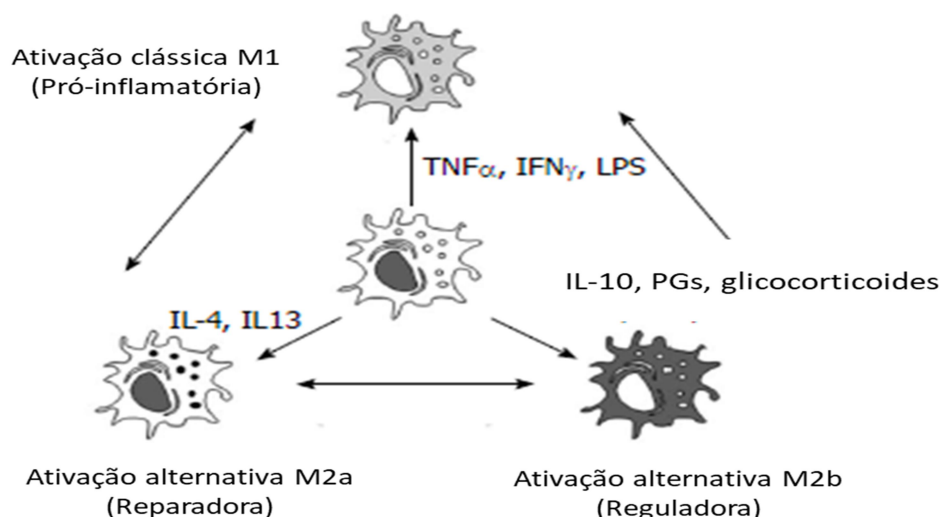
Macrófagos foram descritos pela primeira vez por Metchnikoff, na década de 1880, como grandes células fagocíticas mononucleares. Tradicionalmente, seu papel predominante tem sido considerado no contexto de defesa do hospedeiro contra estímulos ambientais e inatos prejudiciais (GEISSMANN et al., 2010). Essas células diferem morfológica e fenotipicamente em órgãos como fígado, baço, pulmão, intestino e cérebro, e interagem com outros tipos de células. Eles são ativos na biossíntese e expressam uma ampla quantidade de receptores, reconhecendo estímulos estranhos ao organismo, bem como células normais e anormais e produtos derivados do hospedeiro (GORDON; MARTINEZ, 2010). De forma crescente, os macrófagos estão sendo considerados fundamentais em todos os aspectos da homeostase dos tecidos, e suas diversificadas funções são atribuídas à sua notável plasticidade (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófagos são divididos em subpopulações com base em sua localização anatômica e fenótipo funcional. Em relação à localização anatômica, podem ser divididos em dois grupos: residentes ou recrutados. Os macrófagos residentes nos tecidos incluem, por exemplo, os osteoclastos no osso, células de Kupffer no fígado e os macrófagos alveolares no pulmão, que formam um grupo de células constantes, que são integrantes do sistema de homeostase dos tecidos. Já os macrófagos recrutados, desempenham papéis fundamentais durante processos de inflamação aguda (MURRAY; WYNN, 2011; POLLARD, 2009).

Independentemente da sua localização, os macrófagos também podem ser divididos em grupos funcionais com base em seus estados de ativação (FLEMING; MOSSER, 2011; MANTOVANI et al., 2002). Nos tecidos, estes fagócitos mononucleares respondem a alterações ambientais com a aquisição de fenótipos funcionais. Em resposta a vários sinais, estas células podem sofrer uma ativação clássica (M1), estimulada por ativação de receptores Toll-like (TLR) e interferon- γ (IFN- γ) ou ativação alternativa (M2), estimulada por citocinas como IL-4 e IL-13. Estes estados de ativação refletem a polarização Th1-Th2 das células T (SICA; MANTOVANI, 2012). Mais recentemente, foi descrita uma terceira classe de

ativação, sendo estes chamados macrófagos regulatórios. Este modelo simplista de classificação é uma ferramenta útil para considerar o fenótipo dos macrófagos, mas desconsidera o verdadeiro espectro de estados de ativação de macrófagos que devem existir *in situ* (Figura 3) (ALBER et al., 2012).

Figura 3 - Diferentes tipos de ativação de macrófagos, dependendo do microambiente.



Fonte: Adaptado de Gea-Sorlí et al., 2010.

Em geral, o fenótipo M1, também chamados de macrófagos classicamente ativados, possui propriedades pró-inflamatórias e de defesa do hospedeiro contra uma variedade de bactérias, protozoários e vírus. Os ativadores clássicos destas células são Lipopolissacarídeos (LPS) e $IFN\gamma$. Esses macrófagos são componentes vitais da defesa do hospedeiro, mas sua ativação deve ser rigorosamente controlada, porque as citocinas e mediadores que eles produzem, quando em excesso, podem levar a danos teciduais (MARTINEZ et al., 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008).

O fenótipo M2a, também conhecido como macrófagos alternativamente ativados, possuem funções anti-inflamatórias e regulam o processo de cicatrização de feridas. Assim como os macrófagos classicamente ativados, podem se desenvolver em resposta a sinais inatos ou adaptativos. Um dos principais sinais responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo M2 é a liberação das citocinas IL-4 e IL-13. Basófilos e mastócitos são importantes fontes iniciais da produção inata dessas citocinas, embora outros granulócitos também possam contribuir (GORDON; MARTINEZ, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófagos regulatórios, também conhecidos como M2b (GEA-SORLI et al., 2011), possuem função predominante de regulação imune. A produção de IL-10 é a mais importante e confiável característica dos macrófagos regulatórios. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que pode inibir a produção e atividade de várias citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12. Os macrófagos regulatórios são, portanto, potentes inibidores de processos inflamatórios (MOSSER; EDWARDS, 2008).

A ativação dos macrófagos é predominantemente ditada por uma combinação de receptores imunes inatos (receptores de reconhecimento padrão/PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e sinalização de citocinas. Expressão de marcadores ou assinaturas fenotípicas, para os estados de ativação de macrófagos murinos são bem descritos. Eles incluem alterações de expressão gênica em arginase-1, YM-1 e YM-2, Fizz-1 e em receptor de manose para ativação alternativa; e alterações em IL-12 e iNOS (enzima óxido nítrico sintase induzível) para ativação clássica (GORDON; MARTINEZ, 2010; SICA; MANTOVANI, 2012).

Os macrófagos alveolares (MA) são células residentes ou recrutadas com funções de reconhecimento de agentes patogênicos, iniciação da defesa do hospedeiro e depuração desses agentes das vias aéreas (HEROLD et al., 2011). Apresentam características particulares, provavelmente em consequência de sua situação anatômica, em contato direto com os poluentes ambientais presentes no ar respirado. Funcionam como fagócitos primários responsáveis por remover partículas tóxicas, infecciosas ou alérgicas das vias aéreas (DONG et al., 2013).

Assim como outros macrófagos residentes de tecidos, possuem relativo fenótipo M2 no estado de "repouso" devido à sua função de homeostase dos tecidos. MA humanos secretam CCL18 (Ligando de quimiocina 18) e IL-10 e isso ocorre devido sua interação com o epitélio alveolar, que mantém estas células com um fenótipo anti-inflamatório, através da interação com CD200, IL-10 e TGF- β (Fator de transformação do crescimento- β) (ALBER et al., 2012; HEROLD et al., 2011; HEROLD; MAYER; LOHMEYER, 2011).

Estudos apontam que, na fase exsudativa da SDRA, os MA têm uma função de amplificar as respostas inflamatórias, enquanto possuem papel resolutivo da inflamação da fase de reparação, para evitar maior lesão tecidual e perpetuação da inflamação pulmonar (DONG et al., 2013). A capacidade de integrar vários sinais no curso da inflamação e de montar uma resposta diferencial capacita esses

fagócitos mononucleares a resolver a inflamação alveolar nas fases posteriores da lesão pulmonar e coordenar processos de reparo do parênquima, que são essenciais para o retorno à homeostase (HEROLD et al., 2011).

Uma vez que os macrófagos orquestram tanto a iniciação como a resolução da inflamação, o grau de ativação dos mesmos pode ser um dos fatores que determinam a gravidade do processo inflamatório durante a SDR decorrente da PA (GEA-SORLÍ; CLOSA, 2010). Uma das maneiras de se avaliar o estado de ativação destas células é através da Citometria de Fluxo. O citômetro de fluxo consiste em um equipamento para medição de partículas ou células de forma rápida e sensível. Uma vez em suspensão, as células são direcionadas através de uma câmara de fluxo para um laser, que sofre dispersão na direção frontal (*Forward Scatter* - FSC) e que está relacionada ao tamanho celular, e na direção lateral (*Side Scatter* - SSC), que está relacionada à granulosidade e complexidade celular (SILVA et al., 2004).

Um dos métodos de citometria mais utilizados para estudar células, envolve a utilização de moléculas fluorescentes conjugadas com anticorpos (fluorocromos), que permitem a diferenciação de diferentes populações celulares e suas características. Os fluorocromos aderem a moléculas específicas na superfície ou no interior celular. Quando o laser encontra o fluorocromo, um sinal fluorescente (fluorescência) é emitido e detectado pelo citômetro. A fluorescência emitida é proporcional ao número de moléculas de fluorocromos ligados à célula (SILVA et al., 2004; VAN RIJT et al., 2004).

Foi demonstrado também que, o efeito citotóxico de vários produtos de MA, contribuem para a lesão pulmonar aguda. Citocinas como TNF- α , IL-1 β , e o óxido nítrico (NO) representam-se como potenciais mediadores-chaves das manifestações locais e sistêmicas da PA. A capacidade dos MA de mobilizar uma grande quantidade de leucócitos e liberar produtos, tais como o NO após a sua ativação sugere que estas células podem estar envolvidas no dano pulmonar associado com PA (GEA-SORLÍ; CLOSA, 2010; MEHTA, 2005; TSUKAHARA et al., 1996; XU et al., 2014).

1.5 Modelos de pancreatite aguda experimental e as contribuições do Laboratório de Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG)

O Laboratório de Estudos da Físio-Farmacologia Gastrointestinal tem se dedicado nos últimos anos em pesquisar sobre os mecanismos funcionais e moleculares da pancreatite aguda experimental, utilizando para isso modelos de indução por ceruleína, por sais biliares e etanol associado ao ácido palmitoléico (POA).

1.5.1 Modelo de PA induzida por ácidos biliares

A PA induzida por perfusão ductal é hoje um modelo de pancreatite aguda necro-hemorrágica bem estabelecido, confiável e reprodutível, com relevância clínica. Esse método foi criado após a hipótese de que, na PA em humanos, a obstrução da papila Vater por cálculos biliares leva a um refluxo da bile para o sistema do ducto pancreático (WITTEL et al., 2008). A litíase biliar desencadeia a autodigestão pancreática, provavelmente, por obstrução transitória do ducto pancreático, pela passagem de um cálculo através da ampola de Vater. Esta obstrução levará a um aumento transitório da pressão no canal de Wirsung, com extravasamento de suco pancreático para o interstício glandular e consequente lesão (ROSA et al., 2004).

A obstrução do ducto pancreático leva ao bloqueio da secreção pancreática, o que por sua vez impede a exocitose dos grânulos de zimogênio a partir de células acinares. Conseqüentemente, os grânulos de zimogênio coalescem com lisossomos intracelulares para formar condensação ou vacúolos, contendo uma mistura de substâncias digestivas e enzimas lisossômicas. O resultante acúmulo de enzimas digestivas, entre elas a tripsina, dentro dos vacúolos pode levar a ativação das mesmas, causando autodigestão pancreática (LANKISCH; APTE; BANKS, 2015).

Esse modelo requer a canulação do ducto pancreático (geralmente a partir da parede do duodeno através do esfíncter de Oddi), fechamento temporário da via biliar perto do hilo hepático, e perfusão retrógrada lenta de uma solução no ducto pancreático. A taxa de infusão é controlada por uma bomba de infusão que mantém a pressão constante evitando sua elevação durante o experimento. Além disso, esse modelo induz deficiência em múltiplos órgãos tais como pulmões, rins, fígado, intestinos e cérebro e pode ser utilizado em coelhos, cães, porcos, ratos e camundongos (CHAN; LEUNG, 2007). Associado a este procedimento ocorre

aumento nos níveis de amilase, lipase, citocinas inflamatórias Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), ativação de tripsinogênio além de necrose e infiltrado inflamatório pancreático (LAUKKARINEN et al., 2007; MUILI et al., 2013). É um modelo tecnicamente difícil, apresentando significativas taxas de mortalidade nas primeiras 24 a 48 horas após a indução, quando utilizado altas concentrações de sal biliar (FOITZIK et al., 2000).

As alterações morfológicas e mecânicas pulmonares resultantes da PA induzida por infusão de ácido taurolitocólico (sal biliar) são semelhantes à lesão pulmonar encontrada em humanos com PA que desenvolvem insuficiência respiratória (PASTOR; MATTHAY; FROSSARD, 2003). A desvantagem deste modelo é a incisão abdominal necessária que tem de ser feita para realizar o procedimento e os conhecimentos anatômicos necessários para inserir a cânula através do orifício do ducto pancreático (HYUN; LEE, 2014).

1.5.2 Modelo de pancreatite aguda alcoólica

Nas últimas décadas tem havido uma acentuada elevação no consumo de álcool espelhado por um aumento da incidência de PA (HUANG et al., 2014). Em um estudo realizado no Reino Unido por Goldacre e Roberts (2004), foi demonstrado que os casos de PA dobraram em um período de 30 anos e que isso foi relacionado com o aumento do consumo de álcool. Contudo, o entendimento da fisiopatologia da PA alcoólica permanece incompleto e atualmente não existe uma terapia específica. Em grande parte, isso pode ser devido a falta de um modelo experimental que se aproxime ao que acontece na clínica (GOLDACRE; ROBERTS, 2004; HUANG et al., 2014).

É amplamente conhecido que o uso isolado do álcool não é um modelo confiável para a indução da pancreatite experimental (SCHNEIDER; WHITCOMB; SINGER, 2002). Nesse contexto, o papel da gordura com adjuvante no desenvolvimento da PA tem recebido atenção considerável, em particular pela potencial ligação da gordura aos efeitos prejudiciais observados em resposta ao álcool (CRIDDLE, 2015). Essa associação tem relevância fundamentada em dados epidemiológicos de estudos populacionais que demonstraram que dietas com alto teor de gordura podem ter estreita relação com o desenvolvimento de pancreatite alcoólica aguda e crônica (DUFOR; ADAMSON, 2003), enquanto a

hipertrigliceridemia é um fator de risco independente para ambos (WANG et al., 2009; YADAV; LOWENFELS, 2013). Uma via metabólica comum compartilhada por gordura e álcool pode esclarecer os mecanismos fisiopatológicos subjacentes pelos quais o álcool prejudica o pâncreas exócrino (CRIDDLE, 2015).

No pâncreas, o etanol é metabolizado tanto por via oxidativa como por via não oxidativa. Esta última via, entretanto, é predominante, e gera etil-ésteres de ácidos graxos (EEAGs), a partir da combinação do álcool com ácidos graxos, através da ação de diversas enzimas chamadas de EEAG sintetases (GUKOVSKAYA et al., 2002). Em condições patológicas o excesso de EEAGs, devido ao consumo excessivo de álcool, causa uma elevação sustentada do cálcio citoplasmático na célula acinar pancreática, com consequente ativação prematura de zimogênios, causando danos à célula. Entre os EEAGs, um dos mais estudados é o etil-éster do ácido palmitoleico (ácido palmitoléico - POA), que, associado ao etanol, causa esse aumento sustentado do cálcio (CRIDDLE et al., 2004).

Os efeitos tóxicos *in vivo* diretos dos EEAGs sobre o pâncreas foram primeiramente demonstrados por Werner e colaboradores, que fizeram experimentos administrando o étil-palmitato, um EEAG 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 EEAGs plasmática e pancreática. Além disso, a inibição da via oxidativa exacerbou efeitos tóxicos do etanol (WERNER et al., 2002).

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

Recentemente, Huang et al. (2014) sugeriram um modelo *in vivo*, que utiliza o etanol e seus metabólitos da via não oxidativa como agente indutor da

pancreatite aguda severa. A indução foi feita com injeções intraperitoneais dessas substâncias, em animais CD1. Este modelo é bem promissor, já que mimetiza uma das principais causas de pancreatite em humanos, utilizando uma via pouco invasiva.

1.5.3 Contribuições do Laboratório de Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG)

Nesse contexto de modelos experimentais de PA, no ano de 2015 foi investigado, em célula acinar pancreática isolada de camundongos, padrões de lesão gerados pelos agentes ácido taurolitocólico, etanol e POA, sendo observada intensa despolarização do potencial mitocondrial e necrose das células acinares pancreáticas, os quais foram significativamente revertidas pelo tratamento com uma lectina vegetal (ConA) (DAMASCENO, 2015).

Recentemente, nosso grupo utilizando como referência o estudo de Huang et al., (2014), porém em camundongos Swiss, demonstrou de forma inédita, um modelo de indução de PA alcoólica pela utilização de etanol associado ao POA. Neste estudo, observou-se que a PA gera uma perda de peso significativa, redução na sobrevivência nos animais, além de gerar inflamação, bem como hipernocicepção visceral, que foi correlacionada à macrófagos, mastócitos, receptores purinérgicos e inflamassoma NLRP3 (GIRÃO, 2017).

Diante da grande importância de se estudar o dano pulmonar remoto associada à PA, tomamos esse foco e demonstramos em modelo de indução por ceruleína, alterações inflamatórias, com presença de macrófagos e neutrófilos no parênquima pulmonar e no lavado bronco-alveolar, bem como alterações na função respiratória dos animais com PA edematosa (MORAIS, 2013).

Até onde revisamos a literatura, não encontramos pesquisas correlacionando a PA alcoólica e a principal complicação de PA, o dano remoto pulmonar. Bem como ainda não foi demonstrado a relação dos MAs sobre a inflamação e função pulmonar, sobretudo no recente modelo de pancreatite que utiliza etanol associado ao seu metabólito, bem como por infusão de ácidos biliares em camundongos, sendo esse o objeto desse estudo.

2. JUSTIFICATIVA

A lesão pulmonar aguda decorrente da PA representa um problema de saúde pública, responsável por 60% das mortes na primeira semana da doença, culminando com grandes gastos e sem uma terapia específica. Apesar de ser a complicação mais frequente e a principal causa de morte nos pacientes com PA, a fisiopatologia deste evento, os mediadores, vias inflamatórias envolvidas e as repercussões funcionais decorrentes deste evento, não estão completamente elucidados. O interesse em compreender melhor a relação entre a função pulmonar e o envolvimento inflamatório em modelos experimentais de PA provém da observação de que a disfunção das vias aéreas em seres humanos parece estar relacionada com a gravidade da doença.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a PA edematosa induzida por ceruleína é capaz de causar alterações inflamatórias, com presença de macrófagos e neutrófilos, no tecido pulmonar e no lavado bronco-alveolar. Além disso, foram identificadas diversas citocinas no plasma dos animais investigados, que podem ter envolvimento com a fisiopatologia da lesão pulmonar decorrente da PA. Observou-se ainda modestas alterações na função respiratória dos animais com PA (MORAIS, 2013). Contudo, a necessidade de se estudar alterações pulmonares em modelo de PA grave, que mimetizem fatores etiológicos presentes na clínica, nos despertou grande interesse, especialmente, quando se considera o dano pulmonar decorrente da PA como condição de grande impacto, e por ser esta a responsável pela gravidade e mortalidade na PA.

Neste contexto, destacamos que os modelos de PA alcóolica e biliar são de grande relevância, visto que a PA tem como principais fatores etiológicos os cálculos biliares e abuso de álcool, os quais, experimentalmente, geram uma PA grave, necrosante, que causa considerável mortalidade, semelhante ao que acontece na clínica em humanos. Vale ressaltar ainda que não existe na literatura estudos que demonstrem alterações pulmonares em modelo de PA alcóolica experimental. Além disso, enxergamos a necessidade de aprofundarmos nosso entendimento quanto aos aspectos relacionados à função do pulmão agredido após a PA, podendo isso ser feito por meio de técnicas de avaliação de mecânica pulmonar, bem como de espirometria em camundongos, e apoiamos isso em dois pontos: 1) esse tipo foco mostra-se insipiente na literatura, especialmente em

modelos relacionados às condições clínicas reais; 2) A lesão pulmonar pode acarretar até 60% das mortes em pacientes com PA.

Por ser a PA uma doença inflamatória, consideramos importante também que este aspecto seja elucidado em nossa proposta, com enfoque no papel das células envolvidas. Apesar de em outros modelos de lesão pulmonar relacionado à PA, bem como em outras doenças pulmonares, a relevância das populações de macrófagos já terem sido discutidas, no modelo alcóolico aqui proposto, não há relatos na literatura. Como o macrófago é alvo terapêutico em outros modelos de inflamação (GEA-SORLÍ; CLOSA, 2009), objetivamos também estudar o papel dessas células em nosso estudo.

Propomos, portanto, estudar a lesão pulmonar em um novo modelo de PA alcoólica, bem como na PA induzida por sais biliares, investigando envolvimento dos macrófagos e mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia das repercussões inflamatórias e funcionais pulmonares decorrentes da PA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as repercussões funcionais e inflamatórias pulmonares, explorando as principais células envolvidas, no curso da pancreatite aguda alcóolica e biliar experimental.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar no modelo de PA biliar e do modelo de PA alcóolica:

- Alterações histopatológicas do pâncreas e pulmão;
- Alterações bioquímicas: enzimas pancreáticas (amilase e lipase);
- Alterações inflamatórias do pâncreas e pulmão como: atividade de Mieloperoxidase (MPO), e infiltrado de células no lavado bronco-alveolar;
- Avaliar as respostas funcionais respiratórias (espirometria, mecânica pulmonar e contratilidade diafragmática) nos modelos de PA.
- Estudar o papel do macrófago alveolar no curso da lesão pulmonar decorrente da PA;
- Pesquisar a presença de NO e envolvimento das citocinas TNF- α e IL-1 β e IL-10, no tecido pulmonar e LBA nos modelos de PA;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

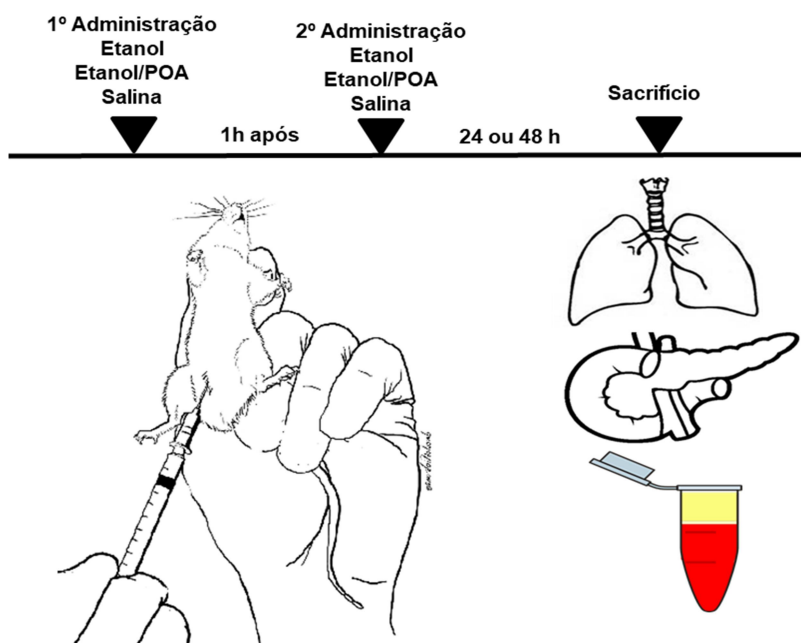
4.1 Animais/Aspectos Éticos

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e também animais C57BL/6 provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinais (LEFFAG), da UFC, sendo aprovados sob o protocolo 79/2013 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição. Também foram realizados experimentos no Laboratório de Imunologia Pulmonar (LIMP) da UFMG, através de colaboração com o professor Remo de Castro Russo, sendo também aprovados pelo CEUA da UFMG, sob o protocolo 406/2015. Em ambos os casos, os protocolos experimentais obedeceram as boas práticas de uso de animais preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.2 Indução da pancreatite aguda biliar (TLC-S)

Para a indução de PA biliar, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.), e submetidos a uma laparotomia mediana, através da qual o ducto pancreático foi cuidadosamente cateterizado via transduodenal com um tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro externo, de acordo com o método descrito por Perides (2010). Em seguida, foram infundidos 50 µL de solução salina (0,9%) ou TLC-S (3%) sob um fluxo constante de 5 µL por minuto, controlado por bomba de infusão. A porção hepática do ducto foi previamente clampeada com uma pinça hemostática, antes da infusão, para evitar o refluxo para o fígado. Foi incluído no estudo um grupo Sham, que foi submetido somente ao procedimento cirúrgico, sem administração de substâncias (**Figura 4**). Os animais foram sacrificados após 24 ou 48hs após indução da pancreatite e amostras de sangue, pâncreas e pulmão foram colhidas e armazenadas em freezer a -70°C para posteriores análises. Amostras de pâncreas e pulmão também foram retiradas e fixadas em formol a 10% para posterior processamento e análise histológica.

Figura 5. Esquema de indução de PA por Etanol/POA



Fonte: Pesquisador

4.4 Alterações histopatológicas do pâncreas e pulmão

Amostras de pâncreas e pulmão foram retiradas, fixadas em formol a 10%, e álcool a 70% embebidas em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5 mm, com auxílio de um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. As alterações morfológicas 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). As alterações avaliadas no pulmão foram edema alveolar, infiltração de PMN e espessamento alveolar. Os escores variaram de 0 a 3, sendo 9 o escore máximo (GULTEKIN et al.,2007). Os dados foram avaliados sob microscopia, em um estudo cego.

4.5 Avaliação das enzimas amilase e lipase

Após 24 horas da indução da pancreatite, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e centrifugados à 3000 g por 10 min à 4°C. A determinação da amilase e lipase sérica foi realizada por método colorimétrico enzimático, usando um kit comercial, de acordo com as instruções descritas pelo fabricante (Labtest Diagnóstico SA, Lagoa Santa, Brasil) e expressos como UI/dL (lipase) e UI/L (amilase).

4.6 Alterações inflamatórias do pâncreas e pulmão

4.6.1 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Para a determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) amostras de pâncreas e pulmão foram colhidos, pesadas e homogeneizadas em HTAB 0,5% (brometo de hexadecil-tri-metil-amônio, na proporção de 50 mg da amostra a cada 500 µL do tampão). Os homogenatos foram centrifugados (20 min, 4.500 rpm, 4 °C), e alíquotas do sobrenadante obtido foram adicionado em uma placa de 96 poços (10 µL), e incubadas com 200µL de uma solução de leitura (contendo 5 mg de cloridrato de o-dianisidina, 27 mL de H₂O destilada, 3 mL de tampão fosfato e 15 µL de H₂O₂ 1%). A atividade de MPO foi medida cineticamente em scanner de placa (BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader) à 450 nm, em intervalos de 0 e 1 min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO por mg de tecido (UMPO/mg tecido) (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

4.6.2 Infiltrado de células no lavado bronco-alveolar (LBA)

O LBA foi realizado com o objetivo de se obter leucócitos presentes no espaço alveolar. Após 24 hs da indução da PA, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A traqueia exposta dos animais foi canulada com um cateter de polipropileno de 1,7 mm. O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1 mL de tampão salina-fosfato estéril (PBS 1X), injetadas e recolhidas 3 vezes cada, obtendo-se aproximadamente 2,0 ml de volume final recuperado do lavado, formando um *pellet* de células que foi utilizado para

contagem total e diferencial de leucócitos. O líquido recuperado foi centrifugado à 2.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi congelado para análises de detecção de proteína total, nitrito e citocinas. O *pellet* do LBA foi ressuspensão em 100 µL de PBS-BSA 3% e diluído 10 vezes em uma solução de Turkey. Dessa solução de células, foram adicionados 10 µL na câmara de Neubauer e, então, realizada a contagem total de leucócitos na objetiva de 40X. Para a contagem diferencial de leucócitos, lâminas foram preparadas em uma cito centrífuga (Cytospin 3, Shandon) e coradas por um kit de panótico rápido (Laborclin). As contagens diferenciais foram realizadas em microscópio óptico com a objetiva de 100X, utilizando-se óleo de imersão (MAXEINER et al., 2007) .

4.6.3 Dosagem de Nitrito

A produção de NO a partir dos MA cultivados, foi avaliada pela dosagem de nitrito, sendo um indicador indireto da produção de óxido nítrico, através da determinação da concentração total de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) nas amostras, determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess (CHEN et al., 2000). Inicialmente, amostras de LBA foram centrifugados à 3000 g por 10 min à 4°C. Para o ensaio, 20 µl de LBA foram incubados por 12 horas com 40 µl de tampão contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados 80 µL da solução de Griess (2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta aparece imediatamente e é medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. A curva-padrão foi obtida a partir de uma série de diluições de NO_2^- (640 µM, 320 µM, 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM e 0,625 µM). Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão.

4.6.4 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteína no LBA foram determinadas pelo método BCA, seguindo as instruções do Fabricante (SIGMA-Aldrich). Inicialmente, os homogenatos (diluídos em tampão de lise) foram centrifugados (14.000 rpm, 5 minutos), e o sobrenadante transferido para tubos de polipropileno, seguido de descarte do pellet. Foram pipetados 25 µL das amostras nos poços da placa de 96

poços, em seguida adicionados 200 µL do reagente de trabalho (reagente A + reagente B; proporção 1:8). Após incubação por 30 min a 37°C, a leitura foi realizada em leitor de placas (FLUOView BMG Labtech, Espanha) a 570 nm. Foi realizada uma curva padrão usando como proteína de referência a albumina sérica bovina (BSA) em concentrações de 0,02 – 0,1 mg de proteína total. As concentrações são Expressa em mg/mL.

4.7 Isolamento, cultivo e estudo dos macrófagos alveolares (MA)

4.7.1 Isolamento e purificação

Os macrófagos alveolares (MA) foram obtidos através do LBA. O fluido do LBA foi centrifugado à 1500 rpm, durante 10 min, 4 °C. O sobrenadante foi coletado para dosagem dos níveis de proteína e o pellet de células foi ressuspensão (1×10^6 células/mL) em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. A suspensão celular foi colocada em placas de 24 poços (10^6 células/poço) e incubada a 37°C sob 5% de CO₂, durante 1 hora. As células não aderentes foram removidas dos macrófagos aderentes por lavagem com meio RPMI 1640. MA purificados foram novamente incubados com meio RPMI, a 37 °C sob 5% CO₂, por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante e as células foram colhidos para determinar a produção de TNF- α , IL1- β , IL-10 e NO (TSUKAHARA et al., 1996).

Viabilidade celular foi avaliada por exclusão, pelo corante Azul de Trypan. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (KONOPKA et al., 1996).

4.7.2 Avaliação do envolvimento de citocinas

Após 24h da indução da PA, os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 no LBA e tecido pulmonar foram medidos utilizando um sistema de ensaio de citocinas multiplex Bioplex (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA), que permite

quantificar múltiplos biomarcadores em um único poço, em uma placa de 96 poços. O princípio do ensaio é similar ao método ELISA. Anticorpos contra o biomarcador desejado são covalentemente acoplados as *beads* magnéticas, que reagem com as amostras contendo o biomarcador de interesse. Após séries de lavagens, um anticorpo bionitilado de detecção é adicionado para criar um complexo.

O complexo de detecção final é formado com a adição de Streptavidina-PE, que serve como um indicador de fluorescência. Resumidamente, 50 µL das *beads* serão colocadas nos poços da placa, a placa foi lavada em lavadora apropriada com 100 µL de tampão de lavagem. Em seguida 50µL do padrão, das amostras e do “branco” foram colocados na placa, que foi incubada no escuro, durante uma hora, à 300 rpm. Adicionou-se 25 µL do anticorpo de detecção e a placa foi novamente incubada a 300 rpm, por 30 min. Mais uma lavagem foi realizada e, finalmente, 50µL de estreptavidina-PE foi adicionada em cada poço e após 10 minutos de incubação e lavagem, as *beads* foram novamente suspensas em 125 µL 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 Laboratories®, Hercules, CA, EUA).

Os dados foram analisados utilizando o Bio-Plex Software Manager (versão 3.0, Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o manual de instruções do fabricante do kit (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA).

4.7.3 Estudo dos macrófagos por citometria de fluxo

O fluido do LBA foi centrifugado à 1500 rpm, durante 10 min, à 4° C. O sobrenadante foi coletado e o sedimento celular foi ressuspenso em 1 ml de tampão de FACS (PBS + SFB 2%); as células foram, então, submetidas a marcação com anticorpos. Para marcação de macrófagos foram utilizados anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-F4/80 (conjugado à FITC) e anti-CD11b (conjugado a PerCPCy5.5). A identificação fenotípica da população foi feita com anticorpos anti-CD206 (conjugado a APC), para população M2. Todos os anticorpos foram adquiridos na empresa eBioscience, San Jose, CA, USA.

Os anticorpos foram adicionados às células e incubados por 30 minutos à 4°C. Em seguida as células foram lavadas com tampão de FACS, o sobrenadante foi

descartado cuidadosamente e o pellet formado foi suspenso em 100 µL de tampão de FACS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSVerse® (BD Bioscience). Um total de 10 mil eventos foram coletados e os resultados foram expressos através de mediana de intensidade de fluorescência (MIF) e em histogramas. Os dados foram analisados empregando-se o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Primeiramente foi selecionada a população com características de macrófagos, utilizando os parâmetros de dispersão direta (Forward Scatter ou FSC) FCS-A e de dispersão lateral (Side Scatter ou SSC) SSC-A. Posteriormente, foi feita a exclusão de células agrupadas (*doublets*), utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. Para caracterizar macrófagos, consideramos as células duplo-positivas para CD11b e F4/80. Para caracterizar macrófagos M2, foi feita a delimitação por histograma de células positivas para CD206, a partir das células CD11b⁺F4/80⁺.

4.8 Avaliação das respostas funcionais

4.8.1 Espirometria

A análise da função pulmonar foi realizada 24 ou 48 horas após a indução da PA. Os animais foram anestesiados (Cetamina 100 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) por via i.p., traqueostomizados e colocados em um espirômetro para pequenos animais (AD Instruments®, Sidney, Austrália), onde permaneceram por dez minutos e os seguintes parâmetros foram avaliados: Fluxo, Volume Corrente (VC), Frequência Respiratória (FR) e Volume Minuto (VM); os dados foram obtidos e analisados através do software LabChart® (GUENTHER et al., 2010).

4.8.2 Mecânica Pulmonar

Após 24 ou 48 horas após a indução da PA, os camundongos foram anestesiados com injeção subcutânea de Cetamina (100 mg/Kg) e Xilazina (8.5 mg/Kg), em solução fisiológica, a fim de manter a respiração espontânea sob o efeito do anestésico. Uma vez anestesiados, os animais foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a camada muscular que envolve a traqueia. Uma pequena incisão foi feita na traqueia para

permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems©, Wilmington, North Carolina USA).

Uma vez no plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência de respiração média de 150 inspirações/minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração. Durante a ventilação mecânica, na função respiração controlada (RC) foram detectadas a complacência dinâmica e a resistência. Para determinar a capacidade residual funcional (CRF), a ventilação foi parada ao final da expiração com um fechamento imediato da válvula localizada próximo ao tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a consequente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o CRF (lei de Boyle).

Para determinar a capacidade total pulmonar (CPT) e Volume residual (RV) foram realizadas manobras de pressão-volume quasi-estática. Os pulmões são inflados até uma pressão padrão de +30 cm H₂O e, então, a pressão foi diminuída, lentamente, até uma pressão negativa de -30 cm H₂O. A complacência quasi-estática é definida como a proporção de volume/pressão à 50% da expiração (Cchord50).

Nas manobras rápidas de fluxo-volume, os pulmões foram inflados até +30 cm H₂O (CPT) e, imediatamente, a pressão foi diminuída para -30 cm H₂O, até atingir a sua capacidade residual.

Todas as manobras subótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos (VANOIRBEEK et al., 2010; VLEESCHAUWER et al., 2011).

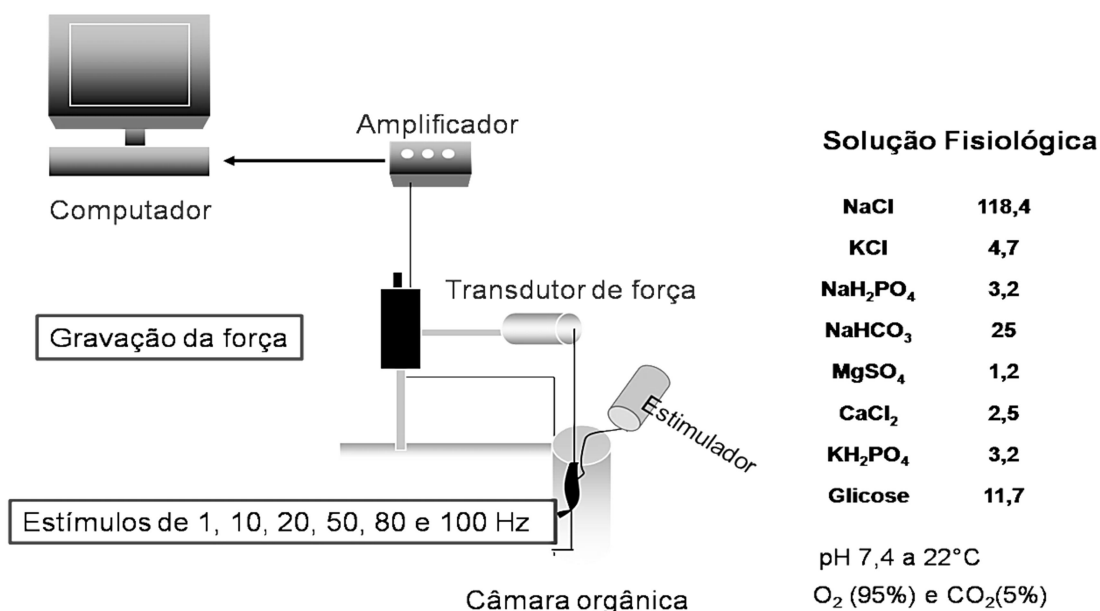
4.8.3 Determinação da contratilidade diafragmática

Tiras de músculo diafragma foram montadas verticalmente em um banho de órgãos contendo solução de Krebs-Henseleit (25° C; NaCl a 118,4 mM; KCl a 4,7 mM; MgSO₄ a 1,2 mM; CaCl₂ a 2,5 mM; Glicose a 11,7 mM e NaHCO₃ a 25,0 mM; KH₂PO₄ a 3,2 mM). Após preparada a solução o pH foi ajustado e mantido entre 7,2 e 7,4. Em seguida, o comprimento do músculo foi mensurado com um paquímetro e

colocado verticalmente em uma câmara com capacidade de 50 ml, contendo a mesma solução fisiológica. Uma das extremidades do músculo foi ligada à base fixa dentro do banho de órgãos e o outro a um transdutor de força isométrico ligado a um sistema computadorizado. Após 15 minutos de equilíbrio, eletrodos de platina foram usados para liberar corrente máximas usando um amplificador de corrente constante. A cinética de contração muscular foi avaliada pela medida da taxa máxima de desenvolvimento de tensão muscular e o tempo necessário para o pico de tensão diminuir em 50% (metade do tempo de relaxamento) durante contrações musculares.

A relação de força e frequência do diafragma foi avaliada sequencialmente estimulando os músculos à 1, 10, 20, 50, 80 e 100 Hz. Cada trem de estímulo foi aplicado por 800 ms, e trens adjacentes foram aplicados em intervalos de 5 segundos. Após a conclusão deste protocolo, a fadigabilidade muscular foi então avaliada, examinando a taxa de diminuição da tensão ao longo um registro de 5 minutos de contração rítmica (**Figura 6**) (MIKAWA et al., 2001). Para o parâmetro de fadiga foi calculada área sob as curvas (ASC) utilizando-se o método do trapézio e expressa em unidades arbitrárias (LANDUCCI et al., 1995)

Figura 6. Esquema para determinação da contratilidade diafragmática



Fonte: Pesquisador

4.9 Análise estatística

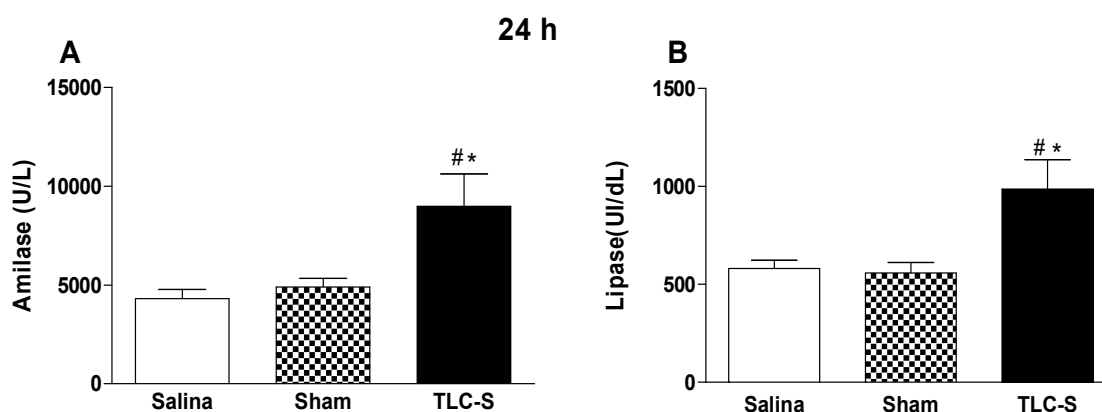
Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M ou como mediana \pm mínimo e máximo. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software GraphPad Prisma (versão 5). Diferenças estatísticas significativas foram avaliadas por Test T ou ANOVA, seguido de teste corretivo de Bonferroni para análise paramétrica. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. O número (n) de animais por grupo experimental foi de no mínimo de 6. Para todos os testes foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

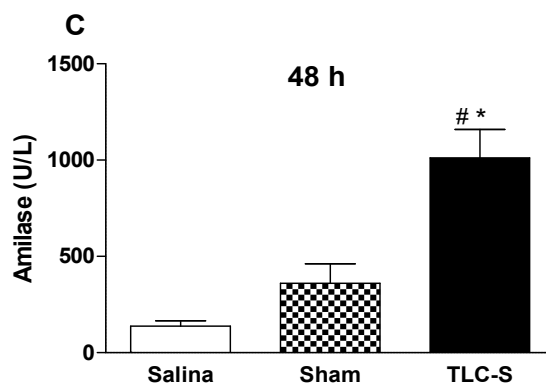
5. RESULTADOS

5.1 Análise da atividade de amilase e lipase plasmática na PA biliar

No tempo de 24 h após o procedimento cirúrgico observou-se que os níveis de amilase apresentaram um significativo aumento no grupo que recebeu infusão de TLC-S ($8987,02 \pm 16,33$), perfazendo um aumento de 97% quando comparado ao grupo Salina ($4301,35 \pm 4,70$), e um aumento de 98% quando comparado ao grupo sham ($4895,63 \pm 4,38$). Resultado semelhante foi encontrado para os níveis de lipase, havendo um aumento de 98% da atividade desta enzima nos animais que receberam TLC-S ($987,40 \pm 1,49$), quando comparados àqueles que receberam salina ($581,09 \pm 4,89$), bem como com o grupo sham ($558,20 \pm 5,32$). No tempo de 48 h, avaliamos apenas amilase, e esta permaneceu com uma elevação de 92% no grupo com PA ($1012,02 \pm 01,48$), quando comparada ao grupo salina ($137,50 \pm 2,85$), e de 97%, quando comparado ao grupo sham ($360,30 \pm 1,01$) (Figura 7).

FIGURA 7 - Níveis séricos de enzimas pancreáticas em modelo de PA biliar. No tempo de 24 h após a indução da PA foram encontrados níveis aumentados de amilase (A) e lipase (B), bem como de amilase às 48 horas (C). Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao Sham.



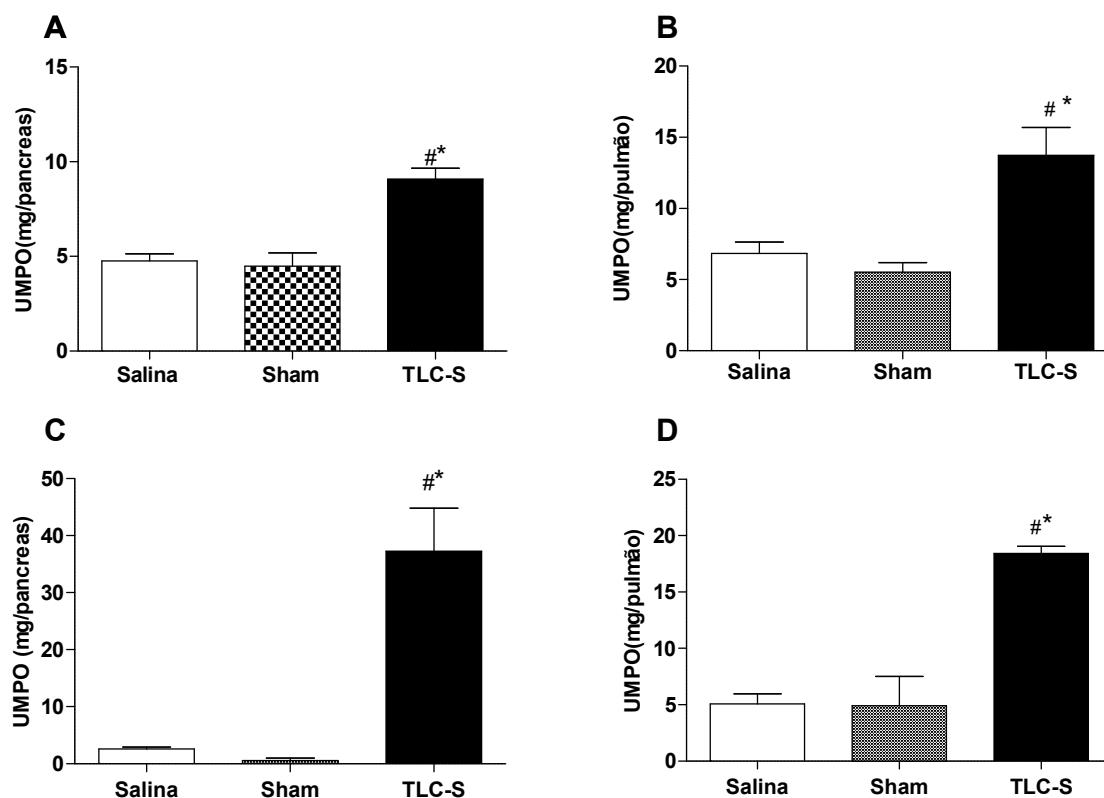


Fonte: dados da pesquisa

5.2 Análise da atividade de MPO pancreática e pulmonar

Após 24 horas, foi encontrado um aumento da atividade de MPO no pâncreas dos animais com PA ($6,73 \pm 1,73$ UMPO/mg de tecido) quando comparados aos grupos salina ($3,14 \pm 0,58$ UMPO/mg de tecido) e sham ($4,16 \pm 0,40$ UMPO/mg de tecido), bem como no pulmão desses animais com PA ($13,76 \pm 7,04$ UMPO/mg de tecido) salina ($6,83 \pm 2,64$ UMPO/mg de tecido) e sham ($5,52 \pm 2,09$ UMPO/mg de tecido). O aumento desta enzima foi ainda maior após 48 horas da indução da PA, no pâncreas dos animais TLC-S ($37,26 \pm 13,05$ UMPO/mg de tecido) quando comparados ao grupo salina ($2,61 \pm 0,60$ UMPO/mg de tecido) e sham ($0,57 \pm 0,69$ UMPO/mg de tecido), assim como no pulmão desses animais ($18,43 \pm 1,40$ UMPO/mg de tecido), quando comparados aos grupos salina ($5,07 \pm 1,97$ UMPO/mg de tecido) e sham ($4,90 \pm 0,62$ UMPO/mg de tecido) (**Figura 8**).

FIGURA 8- Atividade de MPO em animais com PA biliar. São apresentados os valores de atividade de MPO no tempo de 24 h após a indução da PA no tecido pancreático (A) e pulmão (B); no tempo de os valores de MPO também se apresentaram elevados no pâncreas (C) e pulmão (D). Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao Sham.

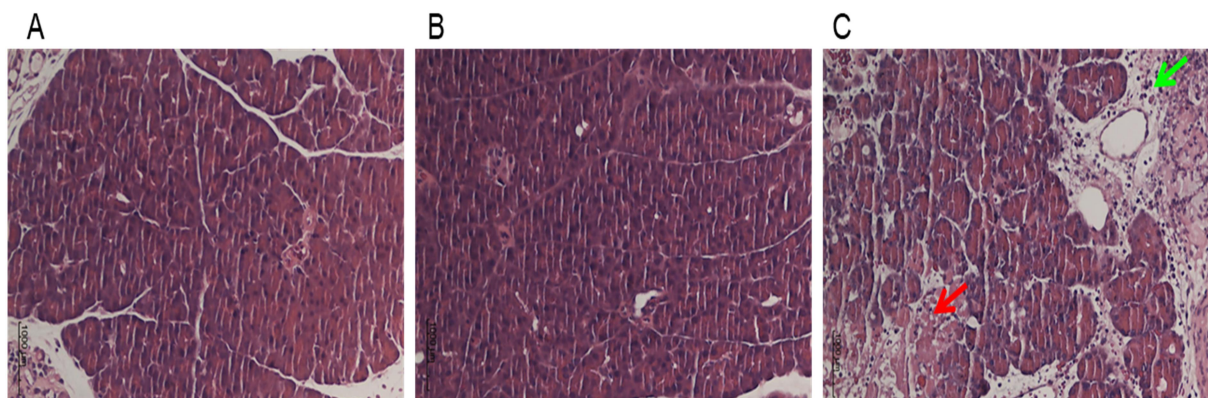


Fonte: dados da pesquisa

5.3 Análise histológica da lesão pancreática e pulmonar

Os tecidos pancreáticos foram analisados histopatologicamente quanto aos escores: edema, infiltração de PMN e necrose de células acinares. Os pâncreas do grupo salina estudados mostraram arquitetura normal e ausência de lesões. Já os tecidos pancreáticos que foram submetidos à infusão de TLC-S revelaram dano tecidual, caracterizado por presença significativa de necrose de células acinares, infiltrado de células inflamatórias e edema (**Figura 9**). As medianas dos escores histológicos estão representadas individualmente na tabela 1.

FIGURA 9- Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA biliar. Método H&E, aumento 400x, do tecido pancreático de animais no tempo de 24 h após a indução da PA. (A) Salina; (B) Sham; (C) TLC-S. Seta vermelha: área de necrose; seta em verde: infiltrado de PMN; PMN: polimorfonucleares.



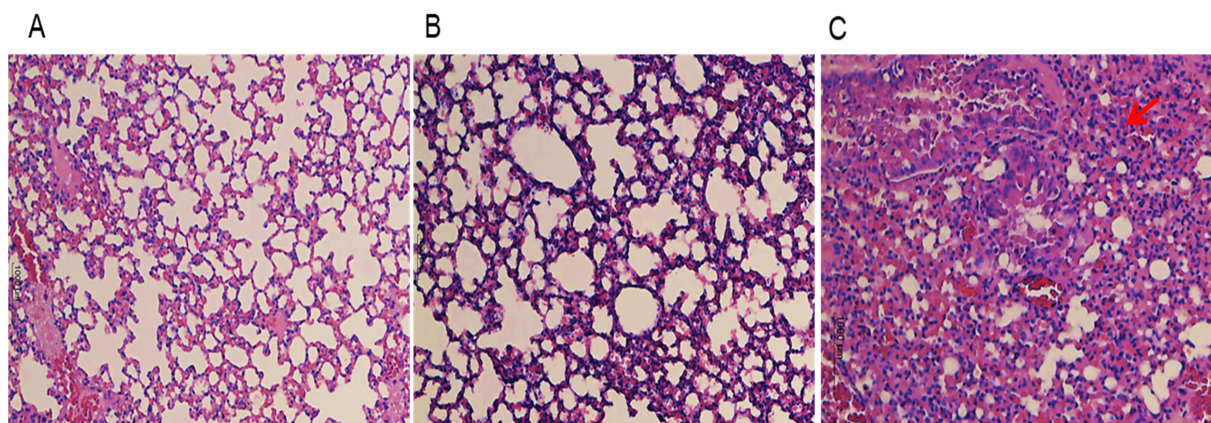
Fonte: dados da pesquisa

TABELA 1- Escores histopatológicos pancreáticos de animais com PA biliar. Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente (n: 8). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; # comparado ao grupo sham. ANOVA e teste Kruskal–Wallis

Grupo	Edema	Infiltrado de PMN	Necrose	Escores Totais
Salina	0 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-6)
Sham	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-3)
TLC-S	2 (1-3)*#	2 (1-3)*#	1 (1-3)*#	5 (3-9)*#

O exame histológico dos pulmões do grupo salina e sham apresentaram arquitetura normal e ausência de lesões. Nos animais do grupo TLC-S foram encontrados uma elevação dos escores relativos a edema, espessamento alveolar e infiltrado de PMN. Quando realizada a contagem total de escores também encontramos o grupo TLC-S com valores superiores aos demais grupos (**Figura 10**).

FIGURA 10- Análise histológica da lesão pulmonar na PA alcóolica. Método H&E, aumento 400x, do tecido pulmonar de animais com PA alcóolica no tempo de 24 h. (A) Salina; (B) Sham; (C) TLC-S; Seta vermelha: infiltrado de PMN PMN: polimornucleares.



Fonte: dados da pesquisa

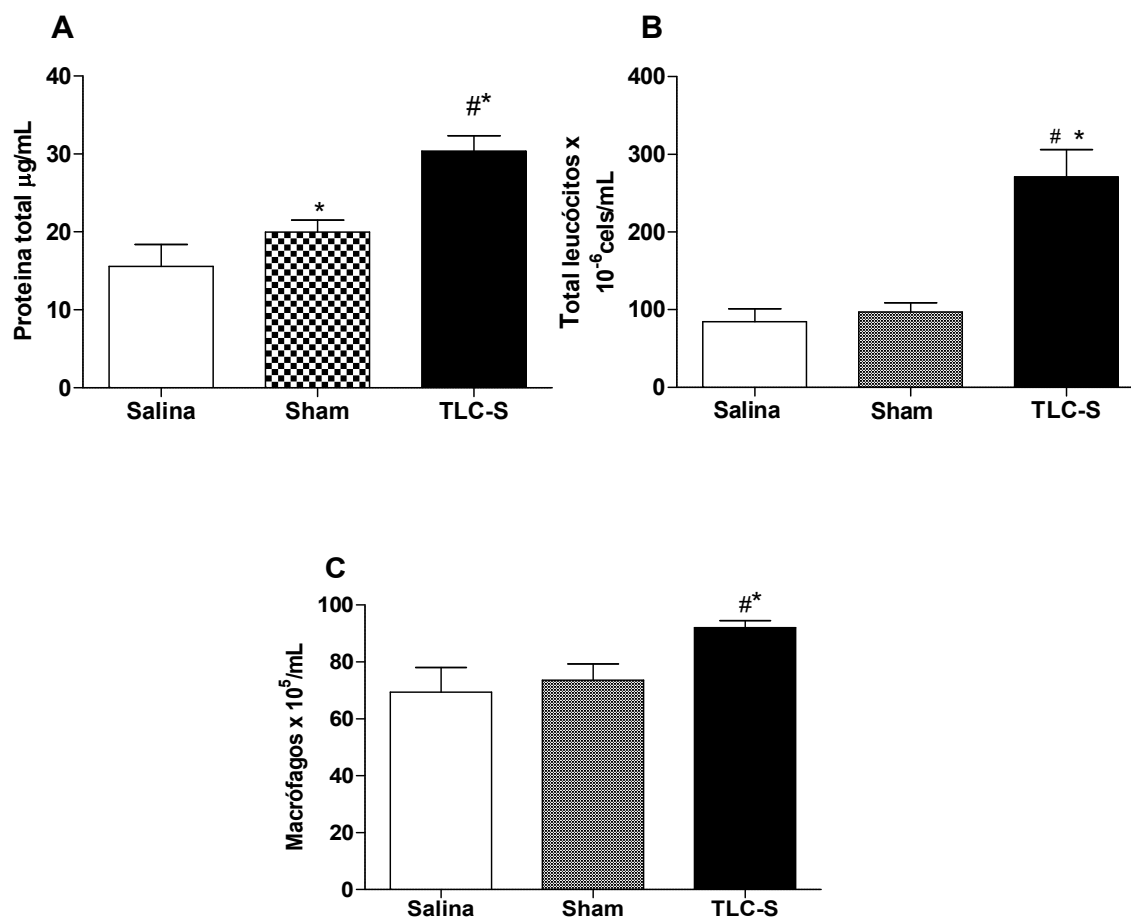
TABELA 2- Escores histológicos pulmonares. Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente (n: 8). *p<0,05 comparado ao grupo salina; # comparado ao grupo sham. ANOVA e teste Kruskal–Wallis

Grupo	Edema	Infiltrado de PMN	Espessamento Alveolar	Escore Total
Salina	1 (0-2)	2 (0-3)	2 (1-3)	5 (3-7)
Sham	1 (1-2)	2 (1-3)	2 (1-3)	5 (3-7)
TLC-S	2 (1-3)*#	2.5 (2-3)*#	3 (2-3)*#	7.5 (5-9)*#

5.4 Análise do Lavado bronco-alveolar (LBA)

Foi observado aumento da proteína total no LBA no grupo TLC-S de 1,9x quando comparado ao grupo salina e de 1,5x quando comparado ao grupo sham. Foi observada também a presença de leucocitose nos animais com pancreatite, quando comparado aos grupos controles salina (3,2x) e sham (2,7x). As células encontradas foram predominantemente macrófagos, havendo um aumento na quantidade destas células no grupo TLC-S quando comparado ao grupo salina (1,3x) e sham (1,2x) (**Figura 11**).

FIGURA 11- Análise do lavado bronco-alveolar em modelo de PA biliar. Após 24 horas da indução da PA, o LBA foi coletado e foi analisada quantidade de proteínas totais (A), contagem total de leucócitos (B), e observado a predominante presença macrófagos (C). Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao Sham.



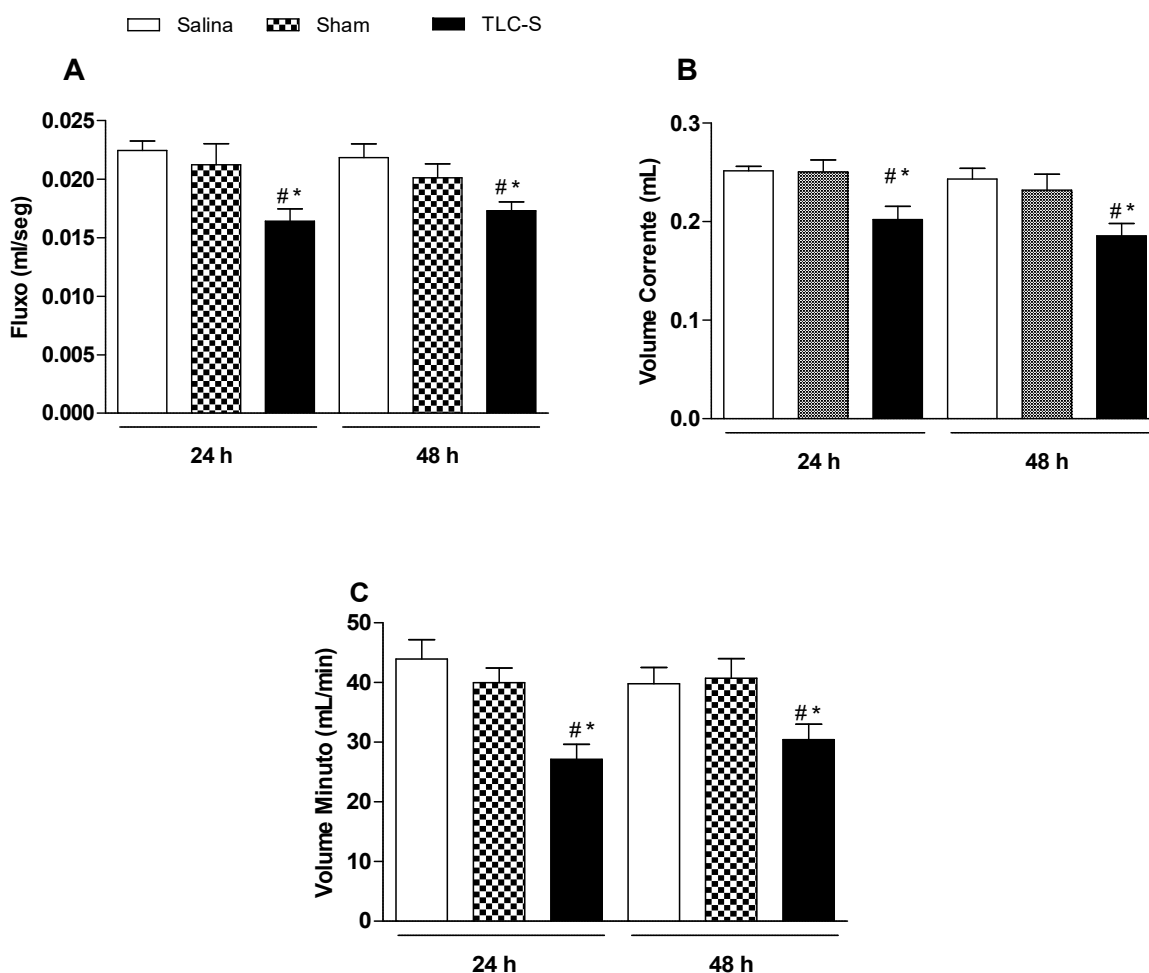
Fonte: dados da pesquisa

5.5 Avaliação da função pulmonar

A espirometria foi realizada 24 e 48 horas após a indução da PA. Houve diminuição significativa, após 24 horas, no fluxo dos animais com PA ($0,16 \pm 0,03$) quando comparados aos animais dos grupos controles salina ($0,22 \pm 0,02$) e sham ($0,21 \pm 0,05$); houve também diminuição no volume corrente desses animais ($0,20 \pm 0,04$) quando comparados aos controles salina ($0,25 \pm 0,01$) e sham ($0,25 \pm 0,02$). Em relação ao volume minuto, houve diminuição deste parâmetro nos animais com PA ($28,62 \pm 8,45$) apenas quando comparado ao grupo salina ($43,94 \pm 8,59$), mas não quando comparado ao grupo sham ($35,68 \pm 9,41$).

A alteração desses parâmetros permaneceu após 48 horas da infusão de TLC-S, com diminuição do fluxo ($0,17 \pm 0,02$ ml/seg) em comparação com o grupo salina ($0,21 \pm 0,03$ ml/seg) e sham ($0,20 \pm 0,02$ ml/seg); diminuição do volume corrente ($0,18 \pm 0,03$ ml) em relação ao grupo salina ($0,24 \pm 0,03$ ml) e sham ($0,23 \pm 0,04$ ml); e diminuição do volume minuto ($30,42 \pm 2,58$ ml/min) em relação ao grupo salina ($38,80 \pm 2,71$ ml/min) e sham ($40,72 \pm 3,28$ ml/min) (**Figura 12**).

FIGURA 12 - Análise da função pulmonar em modelo de PA biliar. Os animais com PA foram submetidos à espirometria nos tempos de 24 e 48 h e analisados: (A) fluxo, (B) volume corrente, (C) volume minuto. Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao Sham.

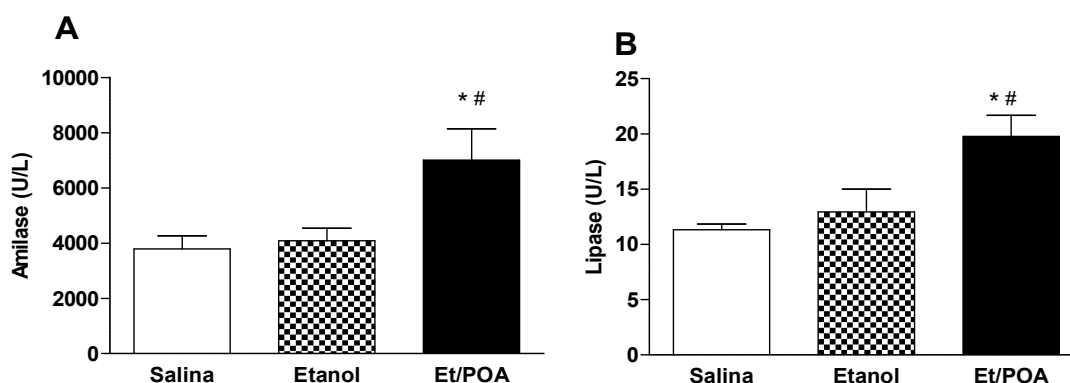


Fonte: dados da pesquisa

5.6 Análise da atividade de amilase e lipase na PA induzida alcoólica

Após 24 h da indução da PA, foi constatado um aumento de 97% nos níveis de amilase nos animais do grupo Etanol/POA ($7554,31 \pm 1,14$), quando comparados aos animais do grupo salina ($3788,65 \pm 4,72$), e um aumento de 98% quando comparados ao grupo etanol ($4085,41 \pm 4,49$), bem como houve aumento de 92% dos níveis de lipase nos animais com PA ($21,76 \pm 1,68$), quando comparado ao grupo salina ($11,32 \pm 0,52$) e um aumento de 67% quando comparado ao grupo etanol ($12,96 \pm 2,05$) (**Figura 13**).

FIGURA 13 – Atividade de amilase e lipase plasmática em animais com PA alcóolica. Após 24 horas da indução da PA foram analisados os níveis plasmáticos de amilase (A) e lipase (B). Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao grupo etanol.

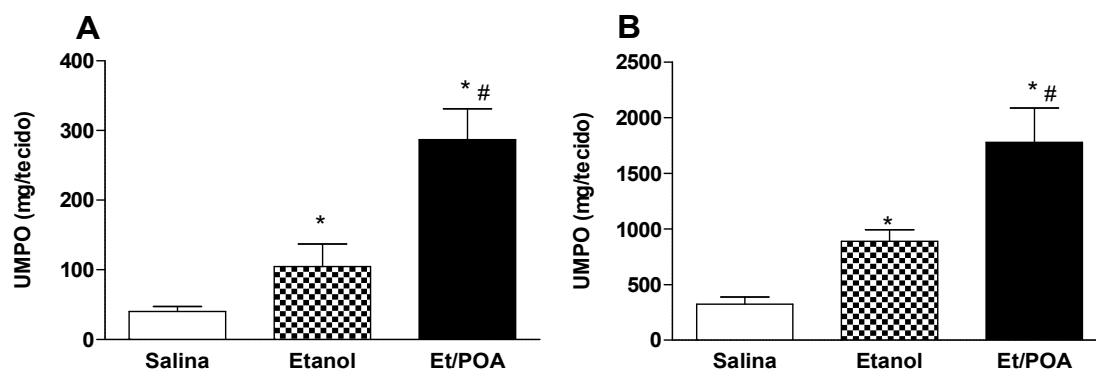


Fonte: dados da pesquisa

5.7 Análise da atividade de MPO pancreática e pulmonar

Foi encontrado um aumento da atividade de MPO no pâncreas dos animais com PA ($286,70 \pm 44,54$ mg de tecido) quando comparados aos grupos salina ($40,18 \pm 7,32$ UMPO/mg de tecido) e etanol ($104,97 \pm 32,16$ UMPO/mg de tecido), bem como no pulmão desses animais, cujos valores foram: Etanol/POA ($2036,13 \pm 376,50$ UMPO/mg de tecido), salina ($324,79 \pm 63,24$ UMPO/mg de tecido) e etanol ($888,90 \pm 103,56$ UMPO/mg de tecido) (**Figura 14**).

FIGURA 14 – Avaliação da atividade de MPO em animais com PA alcoólica. . Após 24 h da indução da PA alcoólica, a atividade de MPO foi analisada no pâncreas (A) e pulmão (B). Os dados são apresentados como média \pm E.P.M; n: 8. Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao grupo etanol.

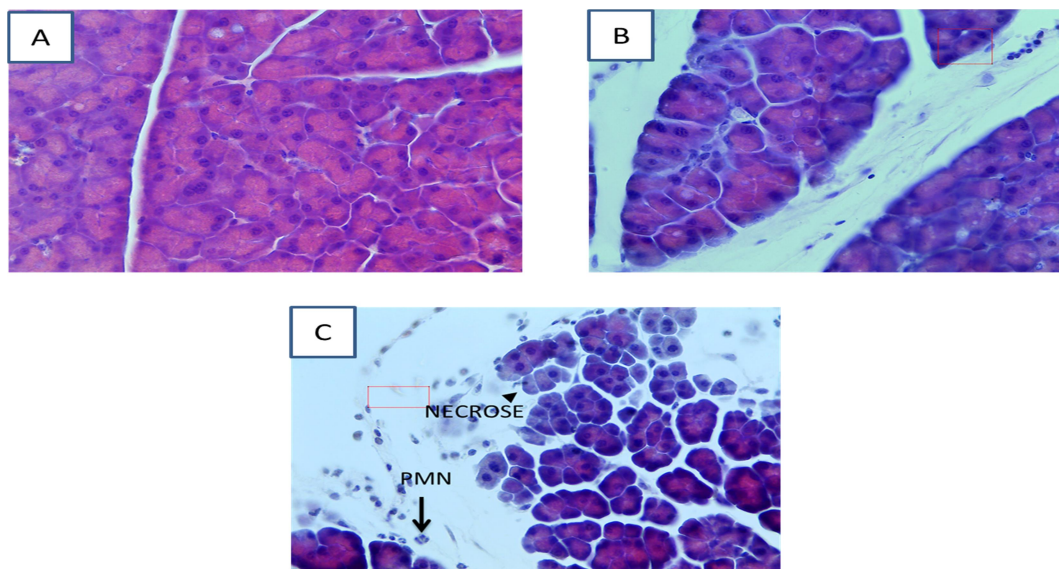


Fonte: dados da pesquisa

5.8 Análise histológica da lesão pancreática e pulmonar

Etanol/POA induziu uma importante alteração histopatológica no parênquima e estroma pancreático e pulmonar. Foi possível observar no parênquima pancreático necrose de células acinares representado por perda nuclear, intenso infiltrado neutrofílico presente na região peri e intralobular. No estroma pancreático observou-se edema representado pelo espaçamento entre os ácinos pancreáticos. A lesão pancreática se estende por mais de 50% do órgão e ocorreu de maneira difusa (**Figura 15C**). Os escores histológicos estão representados individualmente na tabela 3.

FIGURA 15- Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA alcoólica. Método H&E, aumento 400x, do tecido pancreático de animais no tempo de 24 h após a indução da PA. (A)Salina; (B) Etanol; (C) Et/POA. PMN: polimorfonucleares.



Fonte: dados da pesquisa

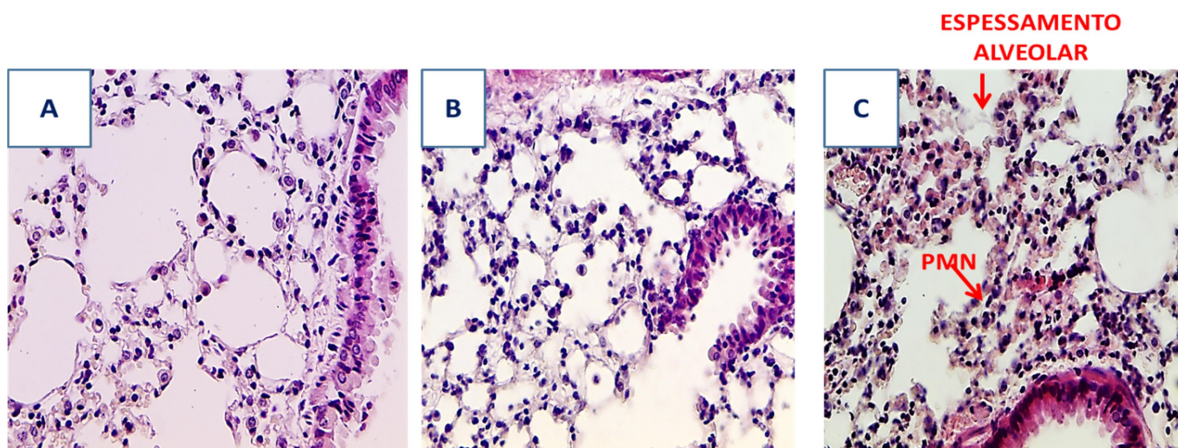
TABELA 3- Escores histológicos pancreáticos. Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente. (n: 8). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; # comparado ao grupo etanol. ANOVA e teste Kruskal–Wallis.

Grupo	Edema	Infiltrado de PMN	Necrose	Escores Totais
Salina	1 (1-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	2 (1-3)
Etanol	1 (0-3)	1 (0-1)	1 (0-1)	3 (2-6)*
Et/POA	2 (2-3)*	2(1-3)*	1 (0-1)*	7(6-9)*#

Fonte: dados da pesquisa

O exame histológico dos pulmões do grupo salina apresentaram arquitetura normal e ausência de lesões. Nos animais do grupo Etanol/POA foram encontrados uma elevação dos escores relativos a edema, espessamento alveolar e infiltrado de PMN (**Figura 16C**). Os escores histológicos estão representados individualmente na tabela 4.

FIGURA 16- Análise histológica da lesão pulmonar na PA alcóolica. Método H&E, aumento 400x, do tecido pulmonar de animais com PA alcóolica no tempo de 24 h. (A) Salina; (B) Etanol; (C) Et/POA. PMN: polimornucleares.



Fonte: dados da pesquisa

TABELA 4- Escores histológicos pulmonares. Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente. (n: 8). *p<0,05 comparado ao grupo salina; # comparado ao grupo etanol. ANOVA e teste Kruskal–Wallis.

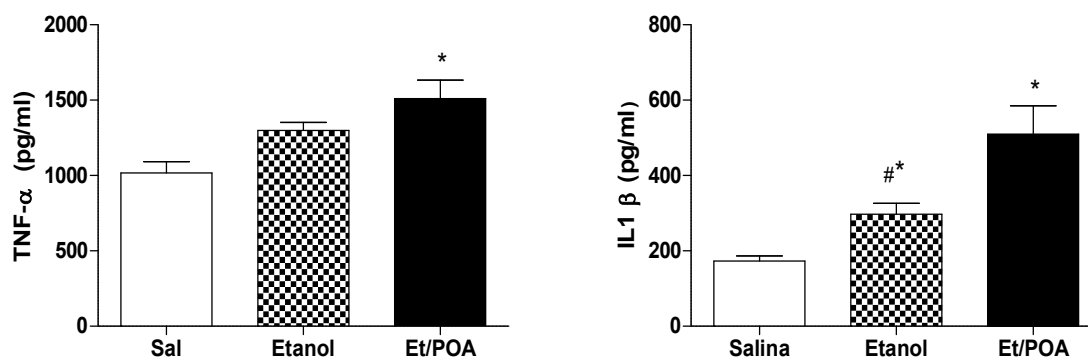
Grupo	Edema	Infiltrado de PMN	Espessamento Alveolar	Escore Total
Salina	2 (1-2)	2 (1-2)	0 (0-1)	4 (4-5)
Etanol	1.5 (1-2)	2.5 (2-3)	1 (0-1)	3 (4-6)
Et/POA	2 (1-2)*	2 (1-3)*	1 (0-1)*	5 (5-6)*

Fonte: dados da pesquisa

5.9 Análise dos níveis de citocinas no tecido pulmonar

Mensuramos os níveis de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar. Etanol/POA causou aumento dos níveis de TNF- α ($1511,32 \pm 12,11$) quando comparado ao grupo controle salina ($1017,21 \pm 7,45$), mas não houve diferença quando comparado ao grupo etanol. Houve também aumento dos níveis de IL-1 β no grupo Etanol/POA ($509,70 \pm 7,55$) quando comparado ao grupo salina ($172,81 \pm 13,40$) e etanol ($297,10 \pm 2,89$) (**Figura 17**).

FIGURA 17 – Avaliação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar em animais com PA alcoólica. Após 24 h da indução da PA alcoólica, foram mensurados os níveis de citocinas inflamatórias no pulmão: (A) TNF- α e (B) IL-1 β . Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao grupo etanol

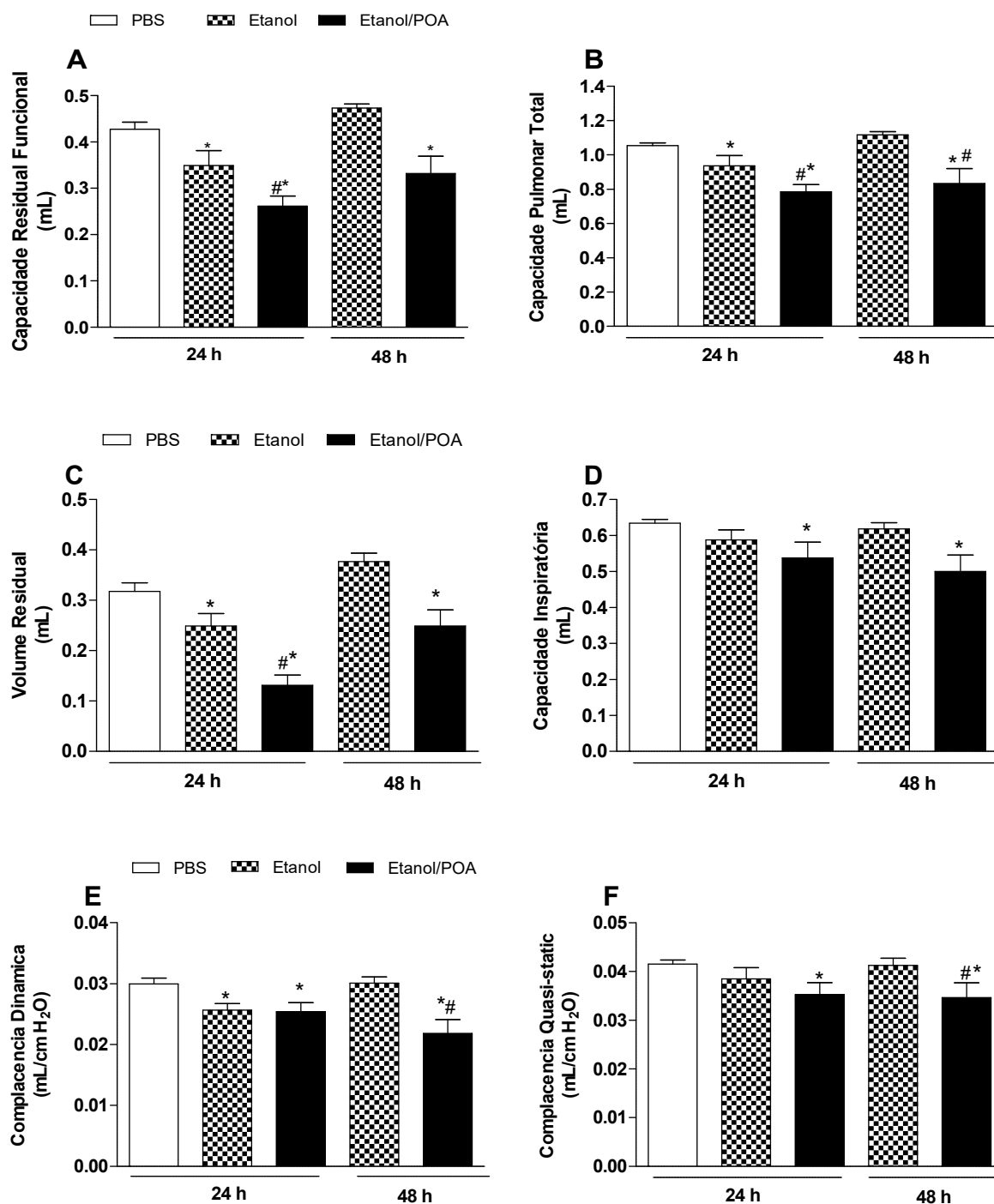


Fonte: dados da pesquisa

5.10 Avaliação da função pulmonar

Além das alterações inflamatórias, alterações funcionais pulmonares foram avaliadas no tempo de 24 e 48 horas após a indução da PA alcóolica nos animais. Foi constatada significativa diminuição: da Capacidade Residual Funcional (CRF) nos grupos Etanol/POA ($0,26 \pm 0,02$ mL) e etanol ($0,34 \pm 0,03$ mL) quando comparados ao controle salina ($0,42 \pm 0,01$ mL), da Capacidade Pulmonar Total (CPT) no grupo Etanol/POA ($0,70 \pm 0,04$ mL) e etanol ($0,91 \pm 0,05$ mL) quando comparados ao grupo salina ($1,05 \pm 0,01$), do Volume Residual (VR) nos grupos Etanol/POA ($0,13 \pm 0,02$ mL/seg) e etanol ($0,24 \pm 0,02$ mL/seg) quando comparados ao salina ($0,31 \pm 0,01$ mL/seg), da Complacência Dinâmica (CDin) nos grupos Etanol/POA ($0,25 \pm 0,01$) e etanol ($0,23 \pm 0,01$) quando comparados ao grupo salina ($0,29 \pm 0,01$), da Complacência quasi-estática (CChord) nos grupos Etanol/POA ($0,35 \pm 0,02$) e etanol ($0,38 \pm 0,02$) quando comparados ao grupo salina ($0,29 \pm 0,01$), e por fim da Capacidade Inspiratória (CI) nos grupos Et/POA ($0,53 \pm 0,04$) e etanol ($0,56 \pm 0,03$) quando comparados ao grupo salina ($0,63 \pm 0,01$) (**Figura 18A-F**).

FIGURA 18 - Análise da função pulmonar em animais com PA alcoólica. Os animais com PA foram conectados a um ventilador mecânico e analisados: (A) CRF (B) CPT, (C) VR, (D) CI, (E) Cdin e (F) Cquasi-static (F). Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao grupo etanol.

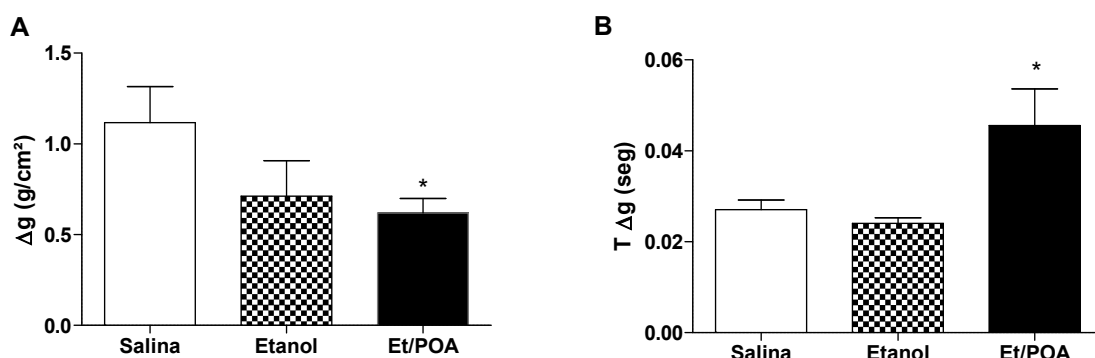


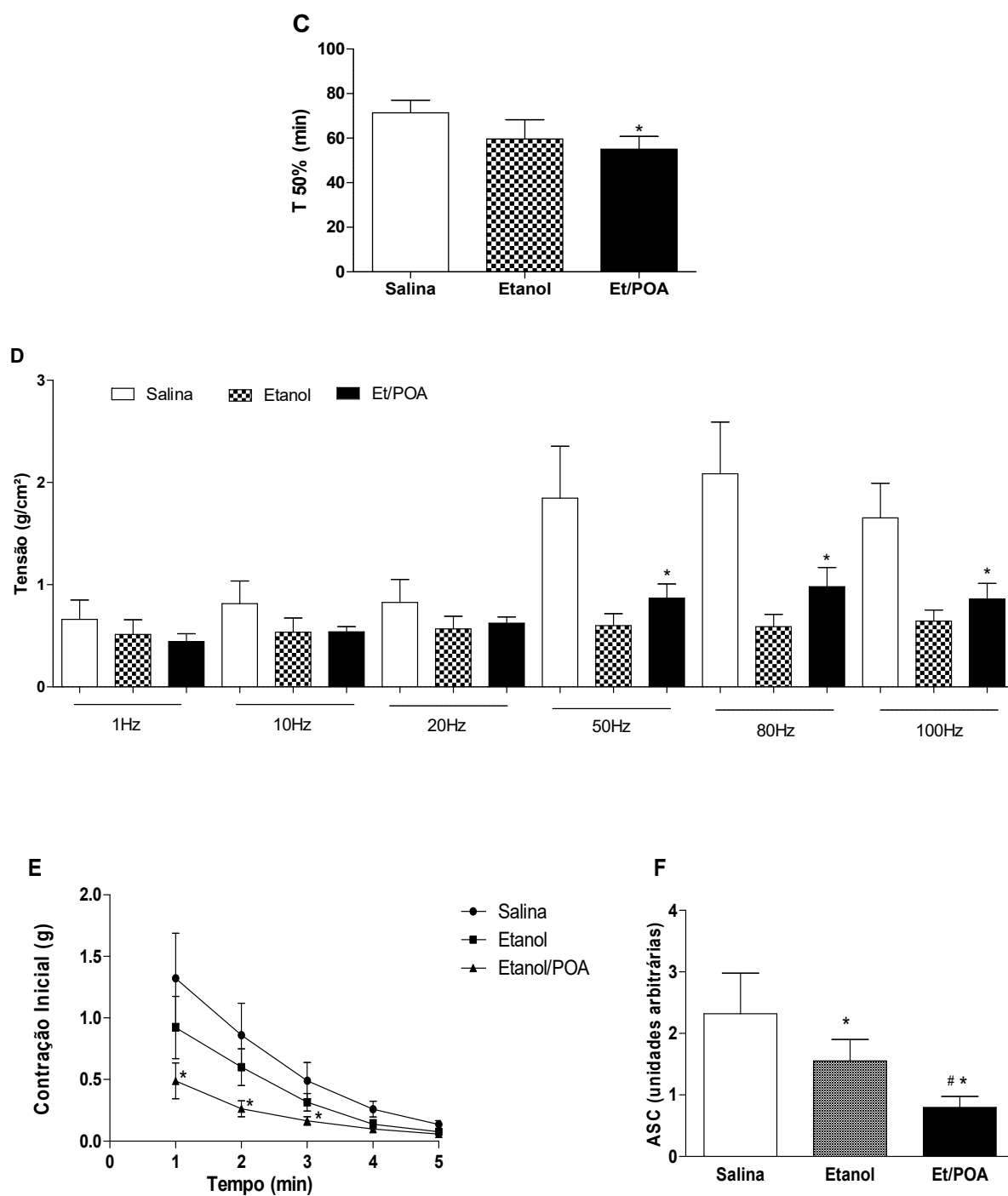
Fonte: dados da pesquisa

5.11 Avaliação da contratilidade diafragmática

A taxa máxima de desenvolvimento de contração diafragmática foi menor no grupo Etanol/POA ($0,61 \pm 0,08$) quando comparada ao grupo salina ($1,11 \pm 0,19$), e etanol ($0,71 \pm 0,48$) (**Figura 19A**). O tempo para que o diafragma atingisse o pico da contração máxima foi maior no grupo Etanol/POA ($0,04 \pm 0,00$) quando comparado ao grupo Salina ($0,02 \pm 0,00$) e Etanol ($0,02 \pm 0,00$) (**Figura 19B**). O tempo para que a tensão diminuísse para 50% do valor inicial foi menor no grupo Etanol/POA ($55,00 \pm 5,83$), quando comparado ao grupo Salina ($71,38 \pm 5,68$) e Etanol ($59,60 \pm 8,68$) (**Figura 19C**). O diafragma dos animais com PA geraram menores tensões quando estimulados com as frequências de 50, 80 e 100 Hz, quando comparados aos grupos controles Salina e Etanol (**Figura 19D**). As tensões ao longo do tempo de 5 minutos, durante a análise da fadiga permaneceram mais baixas no diafragma isolado de animais com PA, quando comparados aos animais Salina e Etanol (**Figura 19E**); este dado se manteve após análise da área sobre a curva (Salina: $2,32 \pm 0,65$; Etanol: $1,55 \pm 0,85$; Et/POA: $0,79 \pm 0,39$ unidades arbitrárias) (**Figura 19E**).

FIGURA 19 - Análise da contratilidade diafragmática dos com PA alcoólica. Diafragmas isolados de animais com PA foram colocados em banho de órgãos e estimulados eletricamente. (A) Taxa máxima de desenvolvimento de tensão muscular; (B) Tempo que o músculo atingiu o pico da contração; (C) Tempo até que a tensão diminua para 50% do valor inicial, (D) Relação entre força e frequência de estímulos, (E) Tensões obtidas durante a análise da fadiga; (F) Fadiga representada em área sob a curva-ASC (unidades arbitrárias) Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao grupo etanol.





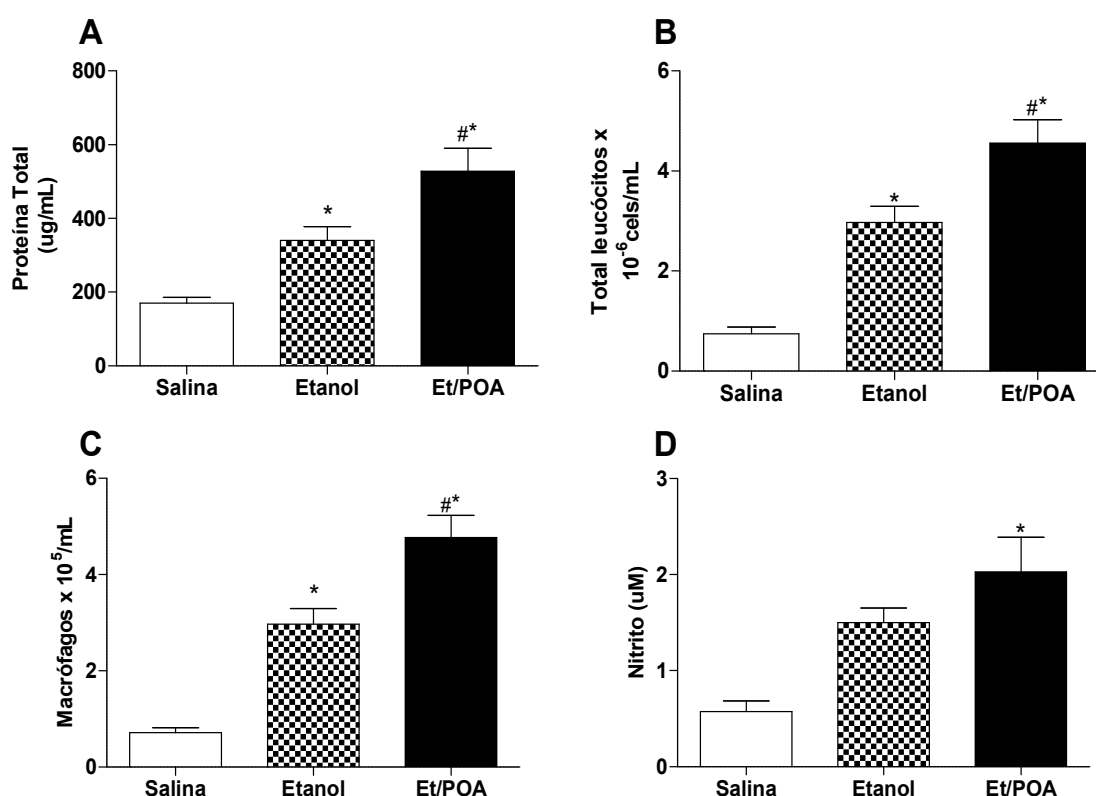
Fonte: dados da pesquisa

5.12 Análise do lavado bronco-alveolar (LBA)

Ao analisarmos o LBA foi observado um aumento na quantidade de proteínas totais no grupo Etanol/POA ($4,55 \pm 0,47$) e etanol ($2,97 \pm 0,31$), quando

comparado ao grupo salina ($0,74 \pm 0,13$). Identificamos também a presença de leucocitose no grupo Etanol/POA ($528,4 \pm 64,65$) e etanol ($340,3 \pm 17,60$) quando comparado ao grupo salina ($170 \pm 15,90$). O principal tipo de célula presente no LBA foram predominantemente macrófagos, havendo maior quantidade destas células nos grupos Etanol/POA ($4,97 \pm 0,46$) e etanol ($2,97 \pm 0,31$) quando comparados ao grupo salina ($0,71 \pm 0,10$). Houve também um aumento na quantidade de nitrito, indicando presença de NO, no grupo Etanol/POA (2.14 ± 0.42 uM), quando comparado ao grupo salina ($0,57 \pm 0,11$ uM), mas não quando comparado ao grupo etanol ($1,50 \pm 0,15$ uM) (**Figura 20**).

FIGURA 20 - Análise do lavado bronco-alveolar em animais com PA alcoólica. Após 24 h da indução da PA alcoólica, foram analisados no LBA os parâmetros: (A) contagem total de leucócitos (B) sendo predominante a presença (C) macrófagos e avaliado (D) os níveis de nitrito. Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao etanol.

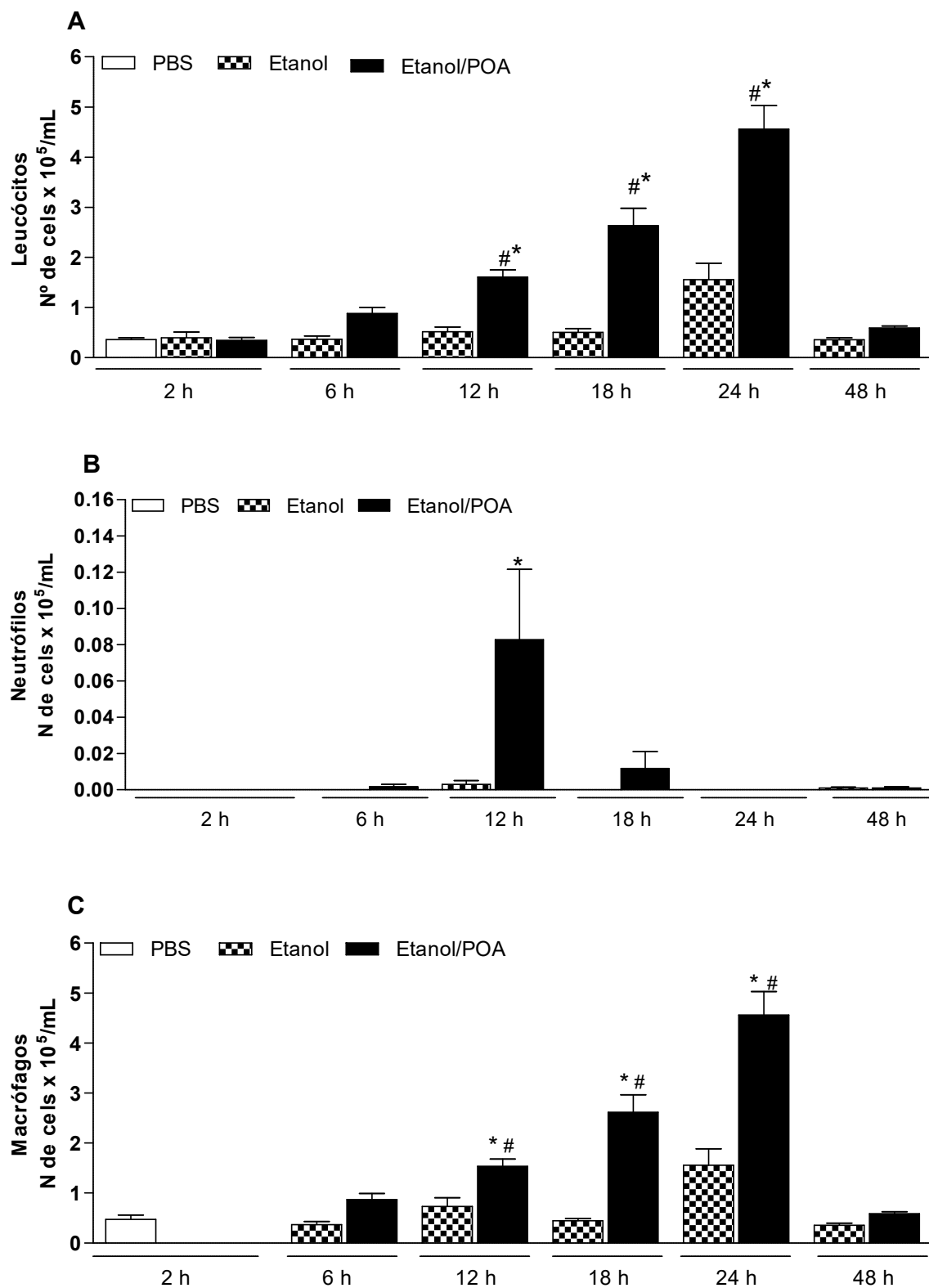


Fonte: dados da pesquisa

5.13 Análise temporal do infiltrado celular do LBA

Foi avaliado que tipo de células estariam presentes no LBA em um curso temporal de 2 até 48 horas após a indução da PA. Como já descrito no resultado anterior, houve uma acentuada leucocitose após a indução da PA, que começou a partir de 6 horas após a indução, ocorrendo o pico máximo de infiltração às 24 horas (**Figura 21A**). Dentre essas células, houve um pico de infiltrado neutrofílico 12 h após a indução da PA, voltando aos valores de normalidade às 18 h (**Figura 21B**). Contudo, o tipo celular predominante foram macrófagos, havendo um aumento gradual a partir de 6 h, com pico máximo às 24 h e voltando aos valores de normalidade às 48 horas (**Figura 21C**).

FIGURA 21 - Análise temporal do infiltrado celular do lavado bronco-alveolar. Após o período de 2-48 h após a indução da PA alcoólica, foram analisados no LBA: (A) contagem total de leucócitos, (B) contagem de neutrófilos e de (C) macrófagos. Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, e, # comparado ao etanol.

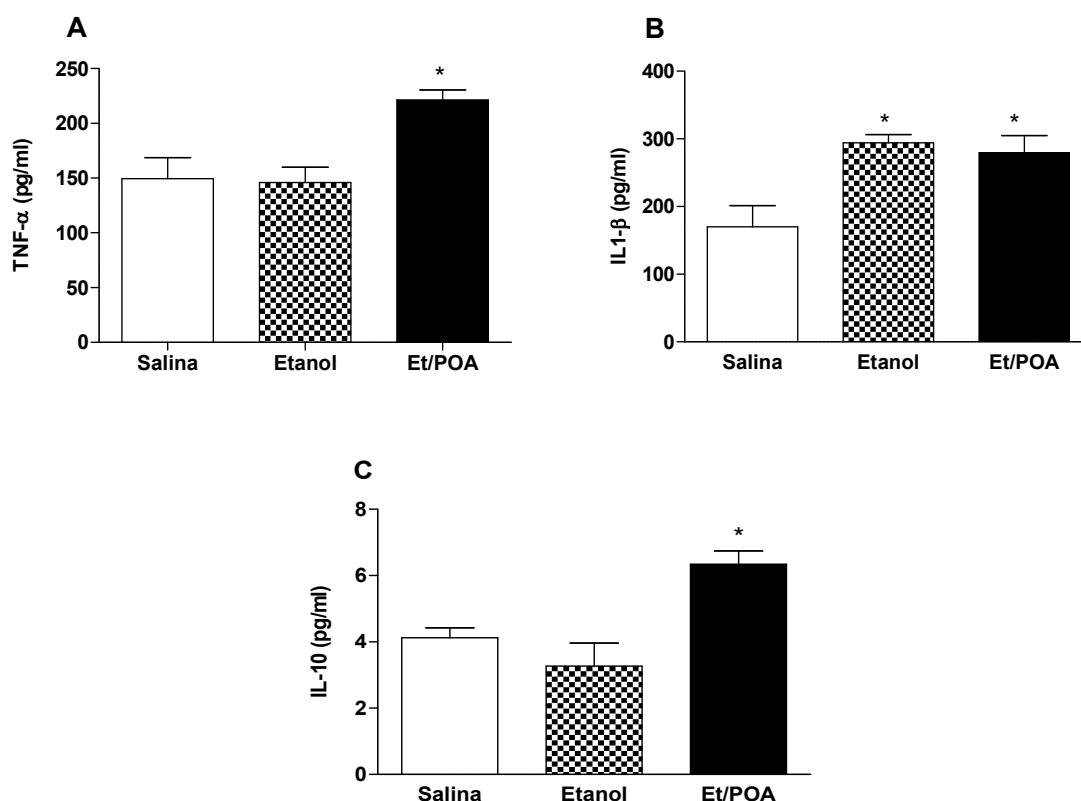


Fonte: dados da pesquisa

5.14 Análise das citocinas presentes na cultura de MA derivados do LBA

Os níveis de TNF- α aumentaram no sobrenadante da cultura de MA derivados dos animais com PA ($221,06 \pm 18,04$) quando comparados aos animais salina ($149,98 \pm 19,17$) e etanol ($146 \pm 13,98$). Da mesma forma, houve aumento da citocina IL-1 β nos animais com PA ($279 \pm 25,37$) quando comparados aos animais controles salina ($170,2 \pm 31,43$) e etanol ($294,1 \pm 12,45$). Houve um discreto aumento da citocina IL-10 no grupo PA ($6,34 \pm 0,40$), quando comparado ao grupo salina ($3,27 \pm 0,69$), e etanol ($4,12 \pm 0,29$) (**Figura 22**).

FIGURA 22 - Análise das citocinas presente na cultura de macrófagos. Após 24 horas da indução da PA alcóolica, o LBA foi coletado e posteriormente realizada cultura de macrófagos. Do sobrenadante da cultura foram analisados os níveis de (A) TNF- α , IL-1 β e (C) IL-10. Média \pm E.P.M. ANOVA e Bonferroni (n: 8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.



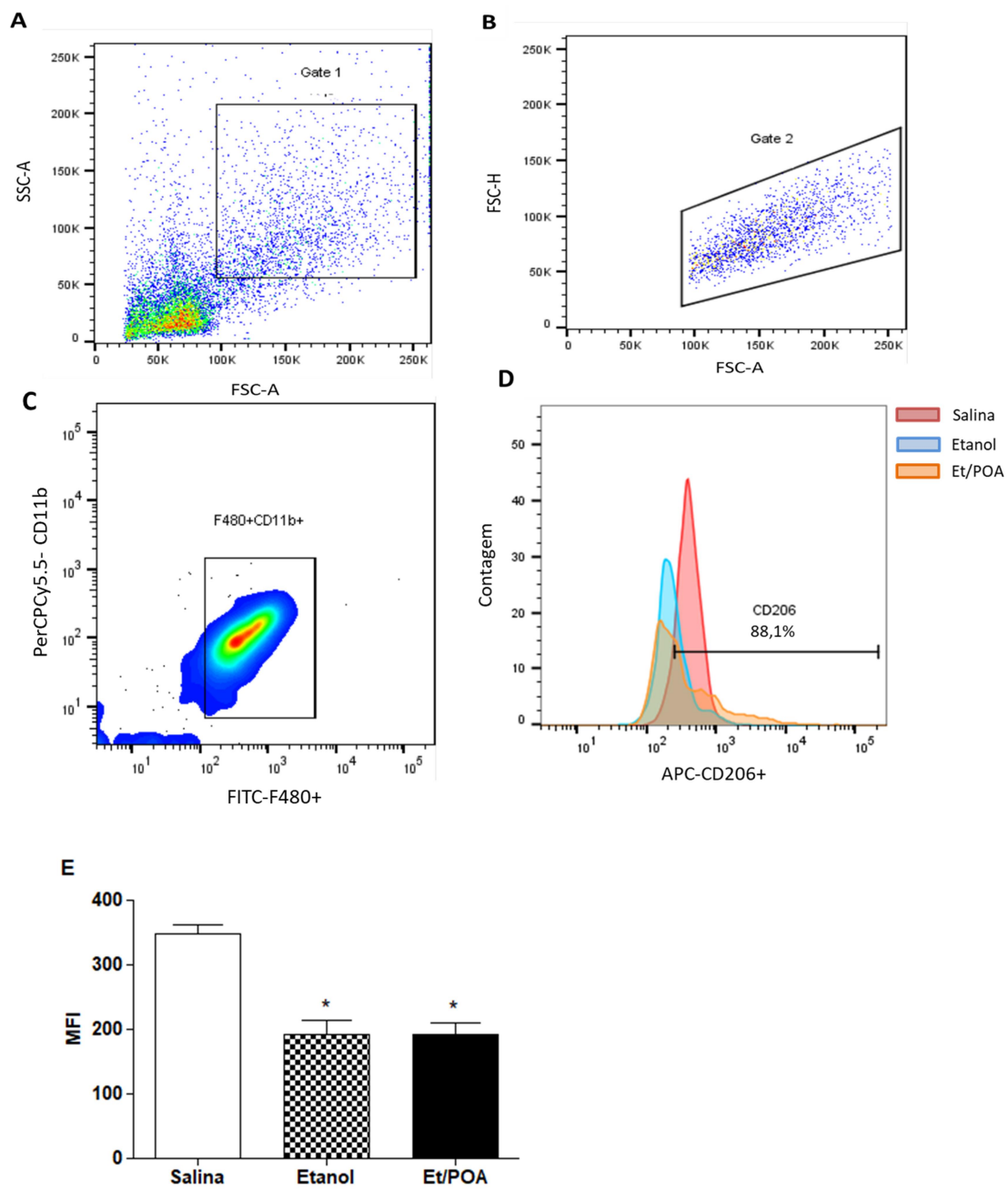
5.15 Análise fenotípica dos MA através de Citometria de Fluxo

Todas as amostras apartir do LBA passaram por uma análise inicial envolvendo um primeiro *gate*, onde os macrófagos foram identificados com base em

seu tamanho e granulosidade, de acordo com as características de FSC-A x SSC-A (**Figura 23A**). A partir do primeiro *gate*, um segundo *gate* foi criado, de “*singlets*”, que prioriza células únicas, sem estarem conjugadas com outras células (*doublets*) ou detritos, de acordo com as características de FSC-A x FSC-H (**Figura 23B**). Posteriormente, um quadrante duplo-positivo para CD11b e F4/80 (**Figura 23C**) foi selecionado. A partir das células positivas para esses marcadores, foi realizada a detecção de macrófagos M2, através de um histograma, utilizando-se um anticorpo específico para CD206.

Podemos observar na **figura 23D**, histogramas que ilustram a intensidade de fluorescência para marcação com CD206 em MA derivados de animais dos grupos salina, etanol e Etanol/POA. Observamos que o histograma dos MA dos animais controle (salina) apresentaram-se deslocados para a direita (área vermelha) quando comparados aos grupos etanol (área azul) e Etanol/POA (área laranja). Quando avaliada a mediana de intensidade de fluorescência (MIF), foi evidenciada uma diminuição significativa dos macrófagos M2 (indicados por células positivas para o marcador CD206), nos animais do grupo Etanol ($192 \pm 22,01$) e Etanol/POA ($191,5 \pm 19,57$), quando comparados aos animais do grupo salina ($349 \pm 13,12$) (**Figura 23E**).

Figura 23- Análise fenotípica dos macrófagos através de citometria de fluxo. MA derivados do LBA foram analisados por citometria de fluxo através dos parâmetros: tamanho e granulosidade (A), exclusão de *doublets* (B), dupla marcação para CD11b e F4/80 (C) e intensidade de fluorescência para CD206 x número de células (D), (E)- MIF para CD206.



6 DISCUSSÃO

Nosso estudo é pioneiro em demonstrar um importante processo inflamatório pulmonar nos modelos de PA biliar e alcoólica experimental em camundongos. Ademais, encontramos uma grave disfunção pulmonar em ambos os modelos, além de explorarmos um possível papel chave das células residentes pulmonares, no desenvolvimento e progressão desta afecção.

PA biliar experimental, que já é bem documentada na literatura, (CERANOWICZ et al, 2015; HYUN, LEE 2014), foi escolhida por ser um modelo que reproduz pancreatite semelhante à induzida por cálculos biliares em humanos, além de permitir o estudo da resposta inflamatória sistêmica (AHO; KOSKENSALO.; NEVALAINEN, 1980). Conseguimos reproduzir o modelo e constatar que PA induz alterações funcionais pulmonares em camundongos, avaliadas por espirometria. O modelo de PA alcoólica experimental, foi baseado no modelo proposto por Huang et al. 2014, que utilizou etanol e sua via metabólica não oxidativa, para induzir PA grave. Em nossa pesquisa, reproduzimos o modelo de Huang et al., 2014 e obtivemos resultados semelhantes aos dos autores, com avaliação de outros parâmetros inflamatórios no pâncreas e pulmão, sendo este último acompanhado críticas alterações em sua funcionalidade.

Inicialmente, a indução de PA foi demonstrada nos modelos biliar e alcoólico observando as alterações nas enzimas amilase e lipase, confirmando que a PA foi induzida com sucesso. As determinações de amilase e lipase sérica são utilizadas para diagnosticar a pancreatite aguda, visto que alterações nos níveis dessas enzimas já estão presentes juntamente com os primeiros sintomas da doença (GRANGER e REMIK, 2005). Além disso, essas enzimas contribuem em um estágio inicial para o dano das células acinares e, conseqüentemente, para processos inflamatórios e produção de citocinas no pâncreas (ZHOU et al., 2018). Girão (2017) e Oliveira (2016), em modelo de PA alcoólica, encontraram dados semelhantes ao nosso estudo quanto às alterações dessas enzimas.

Em acordo com evidências anteriores (CARVALHO et al., 2013, AHN et al., 2013, MALMSTRØM et al., 2012), observou-se aumento da atividade da MPO pancreática e pulmonar, com danos teciduais evidentes nesses órgãos, similares em ambos os modelos. Dessa forma, em nosso estudo, ambos os modelos utilizados foram de pancreatite aguda grave. É importante ressaltar que esse marcador de

infiltração de células inflamatórias (principalmente neutrófilos) pode ter sua atividade no pulmão correlacionada com o grau de lesão pulmonar (KIM et al., 2012; ZHOU et al., 2018). E isso se justifica pelo fato de muitos estudos apontarem os neutrófilos com as principais células imunitárias recrutadas principalmente para os locais de inflamação do pâncreas. Os neutrófilos são considerados ainda como células com um papel fundamental na progressão da inflamação pulmonar (AKBARSHAHI et al., 2012; MANOHAR et al., 2017), visto que, maior sobrevida e alterações histológicas significativamente menores, foram observadas em ratos quando houve a depleção de neutrófilos periféricos e o bloqueio das funções de adesão de neutrófilos (INOUE et al., 1995; MANOHAR et al., 2017).

O principal objetivo do presente estudo foi avaliação do dano pulmonar em modelos PA biliar e alcoólica, com ênfase no estudo da funcionalidade desse órgão no curso desta patologia. A SDRA é a complicação extra-pancreática mais grave decorrente da PA e também contribui para altas taxas de morbidade e mortalidade. No entanto, o mecanismo subjacente à patogênese desse processo permanece mal compreendido (QIAO et al., 2016). A lesão das células acinares durante a PA leva a liberação de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica, ocasionando a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) e nos casos mais graves leva à Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), em que o pulmão é o órgão mais acometido (ZHOU et al., 2010) com o desenvolvimento de SDRA.

Em vários estudos, as alterações inflamatórias do pulmão decorrentes da PA (GULTEKIN, et al., 2007; MATSUDA, et al., 2006) são bem exploradas, contudo, a funcionalidade pulmonar é pouco pesquisada no curso dessa afecção. As técnicas invasivas de avaliação da função pulmonar são ferramentas úteis para descrever modelos de doenças respiratórias em camundongos. A mensuração da função pulmonar em animais de pequeno porte continua sendo um desafio, apesar das grandes melhorias nas técnicas de diferentes equipamentos comerciais (IRVIN et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa já vem desenvolvendo alguns modelos de PA e avaliando as repercussões pulmonares decorrentes dos mesmos. Morais (2013) demonstrou que mesmo uma PA edematosa e transitória, é capaz de causar danos inflamatórios e funcionais no pulmão.

Em nosso estudo, PA biliar e alcoólica cursaram com alterações espirométricas sugestivas de que, a disfunção pulmonar decorrente da PA, tem

características de patologias restritivas e não obstrutivas, como são a asma e o enfisema pulmonar. Uma doença restritiva é uma doença respiratória geralmente associada ao parênquima pulmonar, que faz com que o sistema tenha a complacência diminuída. Portanto, o achado da espirometria destes animais deve ser de volumes e capacidades diminuídas (VANOIRBEEK et al., 2010). Estas informações se confirmam em nosso estudo, sendo traduzidas por alterações em redução de fluxo, volume corrente e volume minuto, na PA biliar, mostrando que há uma deterioração da função pulmonar. Em relação ao modelo de PA alcoólica, observamos alterações nos seguintes parâmetros espirométricos: Capacidade Residual Funcional, Capacidade Inspiratória, Capacidade Pulmonar Total, Volume Residual. Já durante a avaliação da mecânica pulmonar os seguintes parâmetros estavam alterados nos animais com PA: Complacência Dinâmica e Complacência Quasi-Estáticas.

Assim como os parâmetros espirométricos encontrados nos animais com PA em nosso estudo, falam a favor de uma doença restritiva, os parâmetros alterados de mecânica pulmonar, associados às alterações em parâmetros inflamatórios pulmonares, tais como edema alveolar, que discutiremos mais adiante, falam a favor de SDRA. SDRA é o espectro mais grave da lesão pulmonar, caracterizada patologicamente por um dano alveolar difuso e, fisiopatologicamente, pelo desenvolvimento de edema pulmonar não cardiogênico devido ao aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar pulmonar (BARBAS, 2011). SDRA não é uma doença específica, mas sim a agressão da barreira alvéolo-capilar por um ou mais fatores etiológicos ou causais, habitualmente graves e com características inflamatórias, que podem ser de origem pulmonar ou extrapulmonar, como é o caso da PA (PINHEIRO; LISBOA; HOLANDA, 2011).

A espirometria, também conhecida como prova de função pulmonar ou prova ventilatória, é um exame que permite medir o fluxo de ar que entra e sai dos pulmões. Por meio dela, pode-se verificar se existe obstrução ou restrição ao fluxo de ar (PEREIRA, 2002). A mecânica pulmonar estuda as forças que movem os pulmões e a parede torácica, bem como as resistências que elas superam durante o ciclo respiratório, através da medição de parâmetros relativos a elasticidade e rigidez do pulmão (ELDER et al., 2011).

As pesquisas que relacionam lesão pulmonar e função pulmonar com modelos de PA são limitadas e apresentam diferentes resultados. Lichtenstein et al.

(2000) e Milani et al. (1995), detectaram que a função pulmonar em ratos com PA biliar, estava alterada, havendo aumento resistência pulmonar e elastância, parâmetros que não se mostraram alterados em nossa pesquisa. Berry e Taylor (1982), que realizaram um modelo de PA cirúrgica, induzida por ligadura do ducto pancreático em ratos, encontraram diminuição na complacência quasi-estática.

Vanoirbeek et al., 2010, relacionaram diversas patologias pulmonares e as repercussões das mesmas sobre a mecânica pulmonar. As patologias pesquisadas foram enfisema, asma e fibrose. Foi observado que os animais com fibrose, uma doença restritiva, apresentaram declínio no volume corrente, capacidade pulmonar total, complacência dinâmica e complacência quasi-estática, resultados esses que se assemelham aos danos encontrados nos pulmões dos animais com PA em nosso estudo.

Em nosso modelo de PA alcoólica as complacências dinâmica e quasi-estática se encontraram reduzidas. Complacência é um índice que está relacionado com a elasticidade funcional do pulmão; diminuirá se o parênquima pulmonar tornar-se mais rígido por mecanismos como constrição do músculo liso do ducto alveolar, infiltração celular ou edema alveolar. Essas alterações acontecem em pequenas vias aéreas ou parênquima pulmonar, tornando a avaliação da complacência um teste útil para avaliar a periferia pulmonar (DRAZEN, 1976). Pulmões menos complacentes necessitam de altas pressões para conseguir acoplar um volume corrente alvo nos pulmões. São os chamados pulmões duros que encontramos em pacientes com fibrose pulmonar e SDRA (BROCHARD et al., 2012). Segundo Bates (1998), o termo quasi-estático é utilizado porque as condições empregadas aproximam condições estáticas nas quais não há fluxo de gás em nenhum lugar dentro dos pulmões e todas as tensões de adaptação dentro dos tecidos já cessaram.

O grupo de Elder e colaboradores, em modelos de PA induzida por L-arginina e por ceruleína (ELDER et al., 2010; 2011), detectaram que esses modelos resultam em PA grave; no entanto, dentro do pulmões ocorre apenas uma reação inflamatória leve, que não provoca danos estruturais substanciais. Os autores argumentam que estes modelos não são suficientes para reproduzir os efeitos clinicamente relevantes da SDRA e sugerem estabelecer um modelo experimental "two-hit", como a combinação de ceruleína com endotoxina, mimetizando, por exemplo, a deterioração da função pulmonar na PA grave, complicada por infecção. Estes dados foram diferentes dos encontrados em nossos modelos, onde tanto na

indução da PA biliar, como na PA alcoólica, encontramos danos relevantes na função pulmonar, sem a necessidade de um modelo de infecção associado. Também contradizem a pesquisa realizada em nosso laboratório por Moraes (2013), que demonstrou que mesmo uma PA edematosa e transitória, é capaz de causar danos inflamatórios e funcionais no pulmão.

Ainda no âmbito de avaliação funcional do sistema respiratório, confirmamos que PA alcóolica diminui a contratilidade diafragmática, manifestada por alterações das tensões de contrações, mudanças na relação força-frequência, e por fadigabilidade aumentada do diafragma nos animais com PA, sendo o nosso estudo pioneiro em demonstrar essa alteração em camundongos. O mecanismo pelo qual a PA induz disfunção diafragmática ainda é desconhecido. Matuszczak et al., (1999) especularam que existe uma diminuição da força do diafragma, quando este é exposto à IL-1, IL-6 e TNF- α , mediadores tóxicos liberados na cavidade abdominal pelo pâncreas, que contribuem para a insuficiência respiratória associada à PA biliar em ratos. Alterações na produção de NO também foi relatada como tendo um importante papel na disfunção diafragmática decorrente da PA induzida por ceruleína em ratos (MIKAWA et al., 2001; GE et al., 2014).

O desvio cefálico do diafragma é frequentemente observado em pacientes com PA. Isto pode ser secundário a ascites, que elevam o diafragma, pois volume de fluido no compartimento abdominal pode influenciar diretamente a contratilidade do diafragma (LIAO et al., 2018), e/ou derrame na cavidade pleural que causam colapso pulmonar. A disfunção do diafragma induzida por sepse frequentemente resulta em dificuldade para desmamar pacientes gravemente enfermos da ventilação mecânica levando por vezes a uma elevada mortalidade (JIANG et al., 2015). Já em pacientes com paralisia diafragmática, a radiografia de tórax tipicamente mostra baixos volumes pulmonares. Quando mensurados, esses volumes demonstram restrição moderada a severa, com capacidade pulmonar total e capacidade vital reduzida a um intervalo de 30% a 60% do previsto. Este grau de restrição pode ser visto em outras doenças do parênquima pulmonar ou processos restritivos da parede torácica. A força muscular inspiratória também é reduzida para 20% a 30% do previsto em indivíduos com paralisia bilateral (MCCOOL, MANZOOR, MINAMI, 2018).

Estes achados, corroborando com nossos resultados de alterações na complacência pulmonar, na capacidade pulmonar total e na capacidade inspiratória,

sugerem que a SDRA não é a única causa de insuficiência respiratória durante a PA, uma vez que a manutenção de uma boa ventilação pulmonar depende da capacidade dos músculos respiratórios para gerar força e uma disfunção desses músculos, e particularmente do diafragma, durante a PA, pode levar a insuficiência respiratória (MATUSZCZAK et al., 1999), o que sugerimos acontecer no estudo ora apresentado.

Uma hipótese interessante do nosso estudo foi o papel das células residentes pulmonares como células chaves durante a progressão e desenvolvimento dos mecanismos fisiopatológicos da lesão pulmonar decorrente da PA. Estudos recentes indicam que a ativação de numerosas células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, levam a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, regulando a gravidade da SDRA associada a PA (QIAO et al., 2016; YANG et al., 2015).

Observamos em nossos resultados leucocitose e extravasamento vascular, culminando em edema alveolar no líquido bronco-alveolar dos animais com PA. De acordo com Elder et al. (2011), a medida que a condição inflamatória pulmonar se desenvolve, os leucócitos migram para o interior do interstício do pulmão e aumentam a permeabilidade endotelial, resultando em edema tecidual e danos pulmonares. A ativação e migração de leucócitos circulantes para os pulmões são responsáveis pela indução de danos importantes no endotélio pulmonar. Este dano à barreira epitelial leva ao aumento da permeabilidade e, finalmente, o influxo de líquido edematoso rico em proteínas, que pode inativar o surfactante, resultando na diminuição da complacência e em troca de gases prejudicada (WARE, MATTHAY, 2000). Esses dados, juntamente com a disfunção diafragmática, podem justificar a diminuição da complacência nos animais com PA, em nosso modelo.

Ainda durante a avaliação do lavado bronco-alveolar, a concentração de nitrito, indicador indireto da produção de NO, também se mostrou alta. Como a população de células do LBA dos animais com PA era predominantemente constituída de macrófagos (98%), acreditamos que o nitrito encontrado seja derivado dessas células. Além disso, reforçando nossa hipótese, diversos estudos têm apresentado os MA como a principal fonte de NO em modelos experimentais de lesão pulmonar (CHENG et al., 2010; HUFFMAN et al., 2003). NO representa um potencial mediador-chave das manifestações locais e sistêmicas de PA. A capacidade dos macrófagos alveolares de mobilizar uma grande quantidade de

leucócitos e liberar produtos secretores, tais como o NO, após a sua ativação, sugere que estas células podem estar envolvidas no dano pulmonar associado com PA (TSUKAHARA et al, 1996; MEHTA, 2005, GEA-SORLÍ et al., 2010; XU et al., 2014). Além disso, um aumento na produção de NO, pode aumentar a produção de citocinas inflamatórias, a expressão de células endoteliais e fator de aderência de células de músculo liso, expandindo a reação inflamatória e causando aumento da permeabilidade microvascular (CHENG et al., 2010).

Durante a análise temporal do infiltrado celular do LBA, foi observada leucocitose a partir de 12 horas após a indução da PA, sendo o pico de infiltrado celular às 24 horas após a indução. Dos leucócitos predominantes, houve um aumento de neutrófilos às 12 horas após a indução da PA. Contudo, o acúmulo dessas células não foi predominante às 24 horas, havendo um acúmulo de macrófagos nesse período, ou seja, no período de maior infiltração celular, as células predominantes eram macrófagos. Desta forma, os macrófagos parecem ter um papel mais importante no desenvolvimento e progressão da lesão pulmonar em nosso modelo. Com base nestes achados, propusemos a seguinte pergunta: macrófagos alveolares são as principais células envolvidas no desenvolvimento da lesão pulmonar decorrente da PA? Realizamos, então, o estudo mais aprofundado dessas células, para melhor compreensão do seu envolvimento no curso desta patologia.

Os macrófagos desempenham um papel central na geração sistêmica de mediadores inflamatórios durante a PA. Em modelos experimentais de pancreatite, a ativação de diferentes populações de macrófagos, incluindo macrófagos peritoneais (MIKAMI et al., 2003), células de Kupffer (FOLCHI et al., 2000) e macrófagos alveolares foram relatados (TSUKAHARA et al., 1999). No entanto, os macrófagos são células heterogêneas e extremamente versáteis que, em resposta à diferentes microambientes, podem modificar seu fenótipo, mostrando propriedades de polarização diferentes (BONJOCH et al., 2015). Assim, para compreender os mecanismos envolvidos na progressão da inflamação sistêmica e para reduzir o impacto dos danos remotos da PA, é essencial ter em conta o fenótipo adquirido por cada população de macrófagos (GEA-SORLÍ et al., 2010).

Em nosso estudo, observou-se em cultura de macrófagos alveolares de animais com PA, altos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Foi observado também um pequeno aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. A

liberação desses mediadores sugere que essas células adquirem o fenótipo M1, pois são mediadores característicos desse fenótipo e estão envolvidos na progressão da resposta inflamatória (GEA-SORLÍ, et al., 2010). Além disso, em ensaios de citometria, constatamos que, os macrófagos alveolares dos animais controles assumiram um perfil anti-inflamatório M2, identificado pelo aumento da marcação do receptor de manose. Por outro lado, estas células derivadas dos animais com PA, apresentaram uma diminuição dessa marcação. Macrófagos que assumem fenótipo M2a possuem funções anti-inflamatórias e regulam a cura de feridas. Macrófagos M2b secretam grandes quantidades de IL-10, uma citocina anti-inflamatória essencial, com um papel crucial na prevenção da inflamação e de patologias autoimunes (MARTINEZ et al., 2008; GORDON & MARTINEZ 2010).

Nossos dados corroboram com dados da literatura, que demonstram o envolvimento de NO, TNF- α e IL-1 β derivados de macrófagos alveolares, em modelo de LPA em pancreatite biliar em ratos. Quando os animais foram pré-tratados com L-NAME, um inibidor de NO, a expressão de TNF- α foi significativamente diminuída (CHENG et al., 2010). Wang e Kuo (2000), em um estudo clínico, fizeram semelhante avaliação em MA derivados de pacientes com tuberculose, constatando que essas células liberam grandes quantidades de NO e, concomitantemente, sintetizam altos níveis de IL-1 β e TNF- α . Quando estas células foram cultivadas e incubadas com L-NMMA, outro inibidor de NO, houve uma diminuição da liberação destas citocinas. Estes dados sugerem que a liberação destas citocinas pró-inflamatórias, derivadas de MA, podem ser moduladas pelo NO em patologias pulmonares.

Há uma interessante discussão na literatura de que, os mediadores liberados por macrófagos alveolares, possam ser o pivô do desenvolvimento da lesão pulmonar decorrente da PA. Dentre esses mediadores, o TNF- α , que induz e aumenta a expressão de moléculas de adesão, ativam neutrófilos e aumentam sua adesão ao endotélio, e pode, dessa forma, agravar a lesão tecidual pulmonar durante a inflamação (BATHIA et al., 2005). Altos níveis dessa citocina em LBA e plasma são propostos como marcadores na SDRA. Na pesquisa de Dorr et al. (2011), em um modelo de LPA induzida por administração de LPS intratraqueal foi observado um aumento da expressão de receptores de TNF- α no LBA. Contudo, após realizada a depleção de MA nesses animais, houve uma diminuição da

expressão desses receptores, sugerindo e corroborando com nossa pesquisa, que MA são produtores potenciais desse mediador.

Da mesma forma, IL-1 β , que estimula respostas inflamatórias locais e sistêmicas, quando inibida por inibidores de caspase-1, enzima responsável pela clivagem proteolítica dos precursores de IL-1 β , foi capaz de diminuir os parâmetros inflamatórios da LPA na PA experimental, demonstrando seu importante papel no curso desta afecção (ZHANG et al., 2007).

Já a IL-10, uma das poucas citocinas anti-inflamatórias humanas, impede a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , em particular nos macrófagos alveolares, sugerindo que pode diminuir a probabilidade do desenvolvimento de SDRA. Essa citocina também inibe a liberação de IL-6 e IL-1 β . Browne e Pitchumoni (2006) demonstraram que administração de IL-10 antes da indução da PA diminui a gravidade desta doença, o que levanta a possibilidade de seu uso no tratamento clínico da PA (BROWNE, PITCHUMONI, 2006). Já de acordo com Chooklin et al. (2009), no início de uma SRIS, o organismo produz, de forma compensatória, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, sendo a gravidade da doença dependente do equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias.

Uma importante questão levantada seria a polaridade desses macrófagos na lesão pulmonar em nosso modelo de PA. Sustentando nossos resultados, Kambara e colaboradores (2015) mostraram que a depleção de macrófagos M2, em um modelo inflamação pulmonar induzida por endotoxina, interfere de forma negativa no desfecho da lesão, havendo um aumento de citocinas pró-inflamatórias e um agravamento da lesão pulmonar, o que sugere que macrófagos M2 servem como um fenótipo protetor e podem melhorar a inflamação pulmonar durante a endotoxemia.

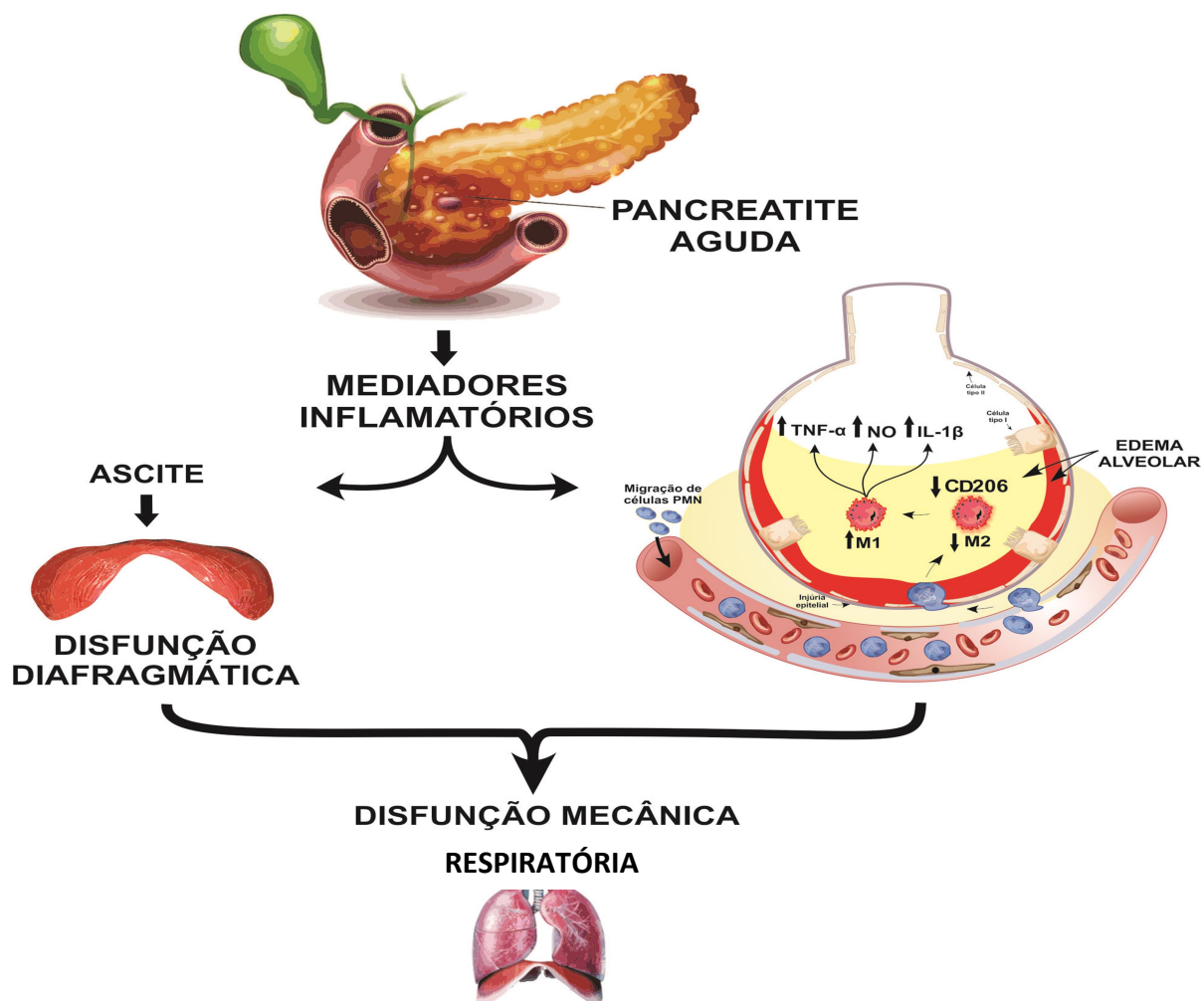
Tu et al., 2017, em modelo de LPA induzida por LPS, observaram que houve uma diminuição de macrófagos M1, e um aumento de macrófagos M2, quando os animais foram tratados com glicocorticoides. Esta mudança de polarização resultou em melhora dos parâmetros funcionais e inflamatórios pulmonares. Recentemente, Tang et al. 2017, observaram a participação de diferentes subgrupos de macrófagos M2 na LPA experimental induzida por endotoxina. Quando esses macrófagos foram adotivamente transferidos para camundongos com LPA induzidos por LPS, tal conduta resultou em significativa

redução da inflamação pulmonar, incluindo uma redução do influxo de neutrófilos no pulmão e modulou apoptose.

Rocha, 2017, em modelo de PA alcoólica, utilizando animais *knockout* para CCR2, receptor da quimiocina CCL2, que recruta macrófagos e é considerado importante marcador de inflamação, observou que em animais deficientes desse receptor houve melhora em parâmetros inflamatórios e funcionais pulmonares, corroborando com nossos resultados e hipótese de que, os macrófagos são importantes mediadores no curso da lesão pulmonar decorrente da PA.

Nossos dados mostram claramente que PA alcoólica cursa com lesão pulmonar aguda, com características de SDRA, levando a importante disfunção pulmonar, caracterizada por alterações na espirometria e mecânica pulmonar. Também demonstramos que essa lesão pulmonar é mediada por macrófagos alveolares, que assumem um fenótipo M1, com importante participação de citocinas pró-inflamatórias na progressão da lesão. Estes dados sugerem que houve um desequilíbrio entre os fenótipos M1 e M2, o que pode justificar a gravidade dos parâmetros inflamatórios e funcionais da lesão pulmonar em nosso modelo de PA. Além disso, a constatação de alterações na contratilidade diafragmática sugere que a SDRA não é a única causa de insuficiência respiratória no curso da PA, como está representado em nosso modelo hipotético na **figura 24**. Desta forma, contribuímos com a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da lesão pulmonar aguda decorrente da pancreatite aguda, o que pode ser importante no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam modular esta afecção.

Figura 24- Resumo esquemático da hipótese mecânica da LPA decorrente da PA.



Fonte: própria autora.

7 CONCLUSÃO

- Pancreatite aguda alcoólica e biliar cursam com importante processo inflamatório pulmonar, com características de síndrome do desconforto respiratório, levando a importante disfunção pulmonar;

- Macrófagos são as principais células envolvidas no desenvolvimento e progressão da lesão pulmonar decorrente da PA;

- Existe um desequilíbrio entre os fenótipos, prevalecendo o fenótipo M1 inflamatório em detrimento do M2 anti-inflamatório, nos macrófagos alveolares dos animais com PA.

- Pancreatite aguda alcoólica causa dano remoto diafragmático, que é importante causa de disfunção do sistema respiratório em nosso modelo.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.
- AKBARSHAHI, H. et al. Acute lung injury in acute pancreatitis – Awaiting the big leap. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 9, p. 1199–1210, 2012.
- ALBER, A. et al. The role of macrophages in healing the wounded lung. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p. 243–251, 2012.
- AHN, D. et al. Inflexinol reduces severity of acute pancreatitis by inhibiting nuclear factor- κ B activation in cerulein-induced pancreatitis. **Pancreas**. v. 42, p. 2, p. 279-84, 2013.
- AHO, H. J.; KOSKENSALO, S. M.; NEVALAINEN, T. J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 4, p. 411-6, 1980.
- AULER JÚNIOR, J. O. C. et al. **Assistência ventilatória mecânica; doenças respiratórias; medicina; medicina intensiva; respiração mecânica**. São Paulo: Atheneu, 1995.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**. 1967 Aug 12;2(7511):319-23.
- AZEREDO, C. A. C. **Fisioterapia respiratória moderna: ampliada e revisada**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2002.
- 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. 102–111, 2013.

BARBAS, C. S. V. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo: Definição. **Sumário Content**, v. 20, n. 1, p. 62, 2011.

BHATIA, M. et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology**. v. 5(2-3), p. 132-144, 2005.

BERNE & LEVY. **Fisiologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009

BERRY, A. R., TAYLOR, T. V. Effect of drugs on the pulmonary changes in experimental acute pancreatitis in the rat. **Gut**. v. 23, n. 6, p. 481-4, 1982.

BONJOCH, L. et al. Minocycline inhibits peritoneal macrophages but activates alveolar macrophages in acute pancreatitis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 839-46, 2015.

BORON, W.F., BOULPAEP, E.L. **Fisiologia Médica**. 2 ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2015.

BRADLEY, E. L. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. **Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 128, n. 5, p. 586–90, 1993.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–22, set. 1982.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações em Saúde - 2011 [acesso em 2017 abr 28]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>

BROCHARD, L. et al. Clinical review: Respiratory monitoring in the ICU - a consensus of 16. **Critical Care**. v. 12, n. 16, p. 219, 2012.

BROWNE, G.-W.; PITCHUMONI, C.-S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. **World journal of gastroenterology**, v. 12, n. 44, p. 7087–96,

28 nov. 2006.

CERANOWICZ P.; CIESZKOWSKI, J.; WARZECHA, Z.; DEMBIŃSKI A. Experimental models of acute pancreatitis. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)**. v. 21, n. 69, p. 264-9, 2015.

CARVALHO A. C. et al. Protective effects of fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis. **Pancreas**. v. 43, n. p. 82-7, 2014.

CHAN, Y. C.; LEUNG, P. S. Acute Pancreatitis. **Pancreas**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2007.

CHENG, S. et al. A crucial role of nitric oxide in acute lung injury secondary to the acute necrotizing pancreatitis. **Human & Experimental Toxicology**. v. 29, n. 4, p. 329-37, 2010

CHOOKLIN, S. Pathogenic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT**, v. 8, n. 2, p. 186–92, 2009.

CRIDDLE, D. N. et al. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: Mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 29, p. 10738–10743, 2004.

CRIDDLE, D. N. et al. Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 exhibit similar actions on calcium signaling, zymogen secretion, and cell fate in murine pancreatic acinar cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, n. 6, p. 1085–1092, 2009.

CRIDDLE, D. N. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. **Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)**, v. 15, n. 4 Suppl, p. 6–12, 2015.

CRUZ-SANTAMARÍA, D. M.; TAXONERA, C.; GINER, M. Update on pathogenesis and clinical management of acute pancreatitis. **World journal of gastrointestinal**

pathophysiology, v. 3, n. 3, p. 60–70, 2012.

DAMASCENO, S. R. B. **Efeito antinecrótico das lectinas conA e conBr na lesão de células acinares pancreáticas induzidas por sais biliares, álcool e ácido palmitoléico : envolvimento do domínio letínico**. 2015. Dissertação (mestrado em farmacologia). Universidade Federal do Ceará, 2015.

DRAZEN, J. M. Physiologic basis and interpretation of common indices of respiratory mechanical function. **Environmental Health Perspectives**. v. 16, p.11-6, 1976.

DE CAMPOS, T. et al. Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 35, n. 5, p. 304–310, 2008.

DE LA MANO, A. M. et al. Cholecystokinin blockade alters the systemic immune response in rats with acute pancreatitis. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 85, n. 2, p. 75–84, 2004.

DONG, H. et al. Comparative analysis of the alveolar macrophage proteome in ALI/ARDS patients between the exudative phase and recovery phase. **BMC Immunology**, v. 14, n. 1, p. 25, 2013.

DORR, A. D. et al. Sources of alveolar soluble TNF receptors during acute lung injury of different etiologies. **Journal of Applied Physiology**. v. 111, n. 1, p. 177-84, 2011.

DUFOUR, M. C.; ADAMSON, M. D. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. **Pancreas**, v. 27, n. 4, p. 286–90, nov. 2003.

DUSHIANTHAN, A. et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. **Postgraduate Medical Journal**, v. 87, n. 1031, p. 612–622, 1 set. 2011.

ELDER, A. S. F. et al. Caerulein-induced acute pancreatitis results in mild lung inflammation and altered respiratory mechanics. **Experimental Lung Research**, v. 37, n. 2, p. 69–77, 2011.

ELDER, A.S. et al. L-Arginine-induced acute pancreatitis results in mild lung inflammation without altered respiratory mechanics. **Experimental Lung Research**. v. 37, n. 1, p. 1-9, 2010.

ELDER, A. S. F. et al. Evaluation of lung injury and respiratory mechanics in a rat model of acute pancreatitis complicated with endotoxin. **Pancreatology**, v. 12, n. 3, p. 240–247, 2012.

FISHER, W.E; et al. **Pancreas - Schwartz's Principles of Surgery**. 10. ed., 2010.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: Setting the Threshold for Therapy. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2498–2502, 2011.

FOITZIK, T. et al. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? **International journal of colorectal disease**, v. 15, n. 3, p. 127–35, 2000.

FRANCO, J. et al. Acute pancreatitis associated with varicella infection in an immunocompetent child. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 45, n. 9, p. 547–548, 2009.

FOLCH, E. et al. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. **Digestive Diseases and Sciences**. v.45, n. 8, p. 1535-44, 2000.

FROSSARD, J.-L.; STEER, M. L.; PASTOR, C. M. Acute pancreatitis. **Lancet**, v. 371, n. 9607, p. 143–52, 2008.

GAISANO, H. Y.; GORELICK, F. S. New insights into the mechanisms of pancreatitis. **Gastroenterology**.v. 136, n. 7, p. 2040-2044.

GE, M. FANG.; Y. Y.; LIU, G. P.; GUAN, S. D. Effect of Shengmai injection () on diaphragmatic contractility in doxorubicin-treated rats. **Chinese Journal of Integrative Medicine**. v. 20, n. 1, p. 43-8, 2014.

GEA-SORLÍ, S. et al. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. **The Journal of Pathology**, v. 223, n. 3, p. 417–424, 2011.

GEA-SORLÍ, S.; CLOSA, D. In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. **BMC Immunology**, v. 10, n. 1, p. 42-31, 2009.

GEA-SORLÍ, S.; CLOSA, D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, n. 5, p. 107, 6 out. 2010.

GEISSMANN, F. et al. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 2010.

GIRÃO, D. K. F. B. **Participação do inflamossoma NLRP 3 e dos receptores purinérgicos na hiperalgesia visceral da pancreatite alcoólica experimental**. 2017. Tese (Doutorado em farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 2017.

GOLDACRE, M. J.; ROBERTS, S. E. Hospital admission for acute pancreatitis in an English population, 1963-98: database study of incidence and mortality. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 328, n. 7454, p. 1466–9, 2004.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

GRANGER, J.; REMICK, D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 24 Suppl 1, p. 45–51, dez. 2005.

GUIMARÃES-FILHO, M. A. et al. Pancreatite aguda: etiologia, apresentação clínica e tratamento. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2009.

GUKOVSKAYA, A. S. et al. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 106–18, 2002.

GULTEKIN, F. A. et al. Leptin treatment ameliorates acute lung injury in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 21, p. 2932–2938, 2007.

GUENTHER, U. et al. Repinotan, a selective 5-HT_{1A}-R-agonist, antagonizes morphine-induced ventilatory depression in anesthetized rats. **Anesthesia & Analgesia**. v. 111, n. p. 901-7, 2010.

HAGIWARA, S. et al. Antithrombin III Prevents Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Rats. **Pancreas**, v. 38, n. 7, p. 746–751, out. 2009.

HALANGK, W.; LERCH, M. M. Early Events in Acute Pancreatitis. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 25, n. 1, p. 1–15, mar. 2005.

HARTWIG, W. et al. Neutrophil metabolic activity but not neutrophil sequestration reflects the development of pancreatitis-associated lung injury. **Critical care medicine**, v. 30, n. 9, p. 2075–82, 2002.

HEROLD, S. et al. Exudate Macrophages Attenuate Lung Injury by the Release of IL-1 Receptor Antagonist in Gram-negative Pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 10, p. 1380–1390, 2011.

HEROLD, S.; MAYER, K.; LOHMEYER, J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 65, 2011.

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.

HUFFMAN, L. J. et al. Nitric oxide production by rat bronchoalveolar macrophages or polymorphonuclear leukocytes following intratracheal instillation of lipopolysaccharide or silica. **Journal of Biosciences**. v. 28, n. 1, p. 29-37, 2003.

HYUN, J. J.; LEE, H. S. Experimental models of pancreatitis. **Clinical endoscopy**, v. 47, n. 3, p. 212–6, 2014.

INOUE, S. et al. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. **Archives of surgery**. v. 130, n. 1, p. 93–8, jan. 1995.

IRVIN, C. G., BATES, J. H. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. **Respiratory Research**. v. 4, n. 4, 2003

JIANG, J. et al. Early Administration of Cisatracurium Attenuates Sepsis-Induced Diaphragm Dysfunction in Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 305–311, 2015.

KAMBARA, K. et al. In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. **The American Journal of Pathology**. v. 185, n. 1, p. 162-71, Jan. 2015

KIM, K. et al. Effect of valproic acid on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion. **Resuscitation**, v. 83, n. 2, p. 243–248, 1 fev. 2012.

KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1312, n.3, p.186-196, 1996.

KRESS, J. P.; HALL, S. **Acute Respiratory Distress Syndrome Harrison - Principles of Internal Medicine**. 19 ed, 2015.

LANDUCCI, E. C. T. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **British Journal Pharmacology**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LANKISCH, P. G.; APTE, M.; BANKS, P. A. Acute pancreatitis. **The Lancet**, v. 386, n. 9988, p. 85–96, 2015.

LAPOSATA, E. A.; LANGE, L. G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. **Science (New York, N.Y.)**, v. 231, n. 4737, p. 497–9, 31, 1986.

LAUKKARINEN, J. M. et al. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. **Gut**, v. 56, n. 11, p. 1590–1598, 29 jun. 2007.

LERCH, M. M.; GORELICK, F. S. Models of Acute and Chronic Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1180–1193, 1 maio 2013.

LEUNG, P. S.; IP, S. P. Pancreatic acinar cell: Its role in acute pancreatitis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 7, p. 1024–1030, 2006.

LIAO, W. C. et al. Diaphragmatic dysfunction in sepsis due to severe acute pancreatitis complicated by intra-abdominal hypertension. **Journal of International Medical Research**. v. 46, n. 4, p. 1349-1357, 2018.

LICHTENSTEIN, A. et al. Acute lung injury in two experimental models of acute pancreatitis: infusion of saline or sodium taurocholate into the pancreatic duct. **Crit Care Med**. v. 28, n. 5, p. 1497-502, 2000.

LOW, J. T.; SHUKLA, A.; THORN, P. Pancreatic acinar cell: New insights into the control of secretion. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1586–1589, 2010.

MANOHAR, M. et al. Chronic Pancreatitis Associated Acute Respiratory Failure HHS Public Access. **MOJ Immunology**. v. 5, n. 2, 2017.

MALMSTRØM, M.L. et al. Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis. **Pancreas**. v. 41, n. 2, p. 271-7, 2012.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–55, 2002.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–61, 2008.

MATUSZCZAK, Y. et al. Alteration in diaphragmatic function induced by acute necrotizing pancreatitis in a rodent model. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 160, p. 1623-8, 1999.

MATTHAY MA, ROBRIQUET L, FANG X. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. **Proc Am Thorac Soc.**;v.2, p. 206-13, 2005.

MATSUDA, N. et al. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Lung Injury in Mice with Acute Pancreatitis Complicated by Endotoxemia. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 198–205, 2006.
MAXEINER, J. H.; KARWOT, R.; HAUSDING, M.; SAUER, K.A.; SCHOLTES, P.; FINOTTO, S. A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. **Natural Protocols**, v. n. 2, p. 105-12, 2007

MCCOOL, F. D.; MANZOOR, K.; MINAMI, T. Disorders of the Diaphragm. **Clinics in Chest Medicine**, v. 39, n. 2, p. 345–360, 2018.

MEHTA, S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. **Vascular Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 390–403, 2005.

MELO, C. M. et al. Anti-inflammatory effect of α,β -amyirin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research**, v. 60, n. 7, p. 673–681, 2011.

MERZA, M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice With Severe Acute Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1920–1931, 2015.

MIKAWA, K.; KODAMA, S.I.; NISHINA, K.; OBARA, H. ONO-1714, a new inducible nitric oxide synthase inhibitor, attenuates diaphragmatic dysfunction associated with cerulein-induced pancreatitis in rats. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1215-21, 2001.

MIKAMI, Y et al. Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? **Pancreas**. v. 27, n. 3, p. 253-60, 2003.

MORAIS, C. M. **Avaliação das alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda experimental induzida por ceruleína**. 2013. Dissertação (mestrado em farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013.

MORETTI, A. I. S. **Efeito da solução hipertônica sobre a expressão de proteínas ativas por choque térmico (HSPs) e atividade de metaloproteinases (MMPs) na resposta inflamatória em pancreatite aguda experimental**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MUHS, B. E. et al. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces local and distant organ injury following experimental acute pancreatitis. **The Journal of surgical research**, v. 109, n. 2, p. 110–7, 2003.

MULI, K. A. et al. Bile Acids Induce Pancreatic Acinar Cell Injury and Pancreatitis by Activating Calcineurin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 1, p. 570–580, 2013.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.

OLIVEIRA, T.B. **Investigação das alterações pulmonares decorrentes da pancreatite aguda alcoólica experimental**. 2016. Dissertação (Mestrado em

Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2016.

PANDOL, S. J. et al. Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside. **Gastroenterology**, v. 132, n. 3, p. 1127–1151, mar. 2007.

PANDOL, S. J. The Exocrine Pancreas. **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**, v. 3, n. 1, p. 1–64, 2011.

PASTOR, C. M.; MATTHAY, M. A.; FROSSARD, J.-L. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. **Chest**, v. 124, n. 6, p. 2341–51, 2003.

PEREIRA, C. A. DE C. Espirometria. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, n. 3, 2002.

PINHEIRO, B. V.; LISBOA, L. F. M.; HOLANDA, M. A. Fatores de risco na síndrome do desconforto respiratório agudo. **Pulmão RJ**, v. 20, n. 1, p. 13-18, 2011.

PINHEIRO, B. V.; OLIVEIRA, J. C. A. SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. **Pneumoatual**. 2004.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, 2009.

QIAO, Y.-Y. et al. Interleukin-22 ameliorates acute severe pancreatitis-associated lung injury in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 21, p. 5023, 2016.

RAWAL, G., YADAV, S., KUMAR, R. Acute Respiratory Distress Syndrome: An Update and Review. **J Transl Int Med**. 2018 Jun 26;6(2):74-77. doi: 10.1515/jtim-2016-0012. eCollection 2018 Jun.

ROCHA, S. L. et al. Gasometria arterial e inflamação pulmonar de ratos com diferentes tempos de sepse abdominal. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, n. 1, p. 28–33, 2007.

ROCHA, L. K. **Estudo do papel do receptor de quimiocina CCR2 no modelo experimental de lesão pulmonar associada à pancreatite aguda induzida por administração de etanol e ácido palmitoleico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017.

ROSA, I. et al. Pancreatite Aguda: actualização e proposta de protocolo de abordagem. **Acta Médica Portuguesa**. v. 17, p. 317–324, 2004.

SAH, R. P.; GARG, P.; SALUJA, A. K. Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, n. 5, p. 507–515, 2012.

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.

SEVILLANO, S. et al. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1639, n. 3, p. 177–84, 2003.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012.

SILVA, T. L. DA et al. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, p. 32–40, 2004.

STEER, M. L. et al. Lysosomal enzymes and pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 965–7, mar. 1996.

TSUKAHARA, Y. et al. Role of Nitric Oxide Derived from Alveolar Macrophages in the Early Phase of Acute Pancreatitis. **Journal of Surgical Research**, v. 66, n. 1, p. 43–50, 1996.

TU, G. W.; SHI, Y.; ZHENG, Y. J.; JU, M. J.; HE, H. Y.; MA, G. G.; HAO, G. W.; LUO, Z. Glucocorticoid attenuates acute lung injury through induction of type 2 macrophage. **Journal of Translational Medicine**. v. 29, n. 15, 2017.

TANG, L. et al. M2A and M2C Macrophage Subsets Ameliorate Inflammation and Fibroproliferation in Acute Lung Injury Through Interleukin 10 Pathway. **Shock**, v. 48, n. 1, p.119-129, 2017.

VAN RIJT, L. S. et al. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. **Journal of Immunological Methods**, v. 288, n. 1–2, p. 111–121, maio 2004.

VANOIRBEEK, J. A. et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 42, n. 1, p. 96-104, 2010.

DE VLEESCHAUWER, S.I. et al. Repeated invasive lung function measurements in intubated mice: an approach for longitudinal lung research. **Laboratory Animals**. v. 45, n. p. 81-9, 2011.

WANG, G.-J. et al. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 15, n. 12, p. 1427–30, 2009.

WANG, C. H.; KUO, H. P. Nitric oxide modulates interleukin 1 β and tumor necrosis factor α synthesis, and disease regression by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. **Respirology**, v. 6, p. 79-84, 2001.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**. v. 4, n. 342, p. 1334-49, 2000.

WÄSLE, B.; EDWARDSON, J. M. The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. **Cellular signalling**, v. 14, n. 3, p. 191–7, 2002.

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. 286–294, 1997.

WERNER, J. et al. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 1, p. 65–73, 2002.

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, maio 2007.

WITTEL, U. A. et al. Taurocholate-Induced Pancreatitis. **Pancreas**, v. 36, n. 2, p. 9–21, 2008.

XU, X.-W. et al. Treatment with ginkgo biloba extract protects rats against acute pancreatitis-associated lung injury by modulating alveolar macrophage. **Przegląd gastroenterologiczny**, v. 9, n. 1, p. 43–8, 2014.

YADAV, D.; LOWENFELS, A. B. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1252–61, jun. 2013.

YANG, Z.; MENG, X.; XU, P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 11, p. 2513–2520, 2015.

ZAHEER, A. et al. The revised Atlanta classification for acute pancreatitis: updates in imaging terminology and guidelines. **Abdominal Imaging**. v. 38, n. 1, p. 125–136, 15 fev. 2013.

ZHANG, X. H. et al. Therapeutic effects of caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 28, n. 13, p. 623-7.

ZHANG, X.-P.; LI, Z.-J.; ZHANG, J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT**, v. 8, n. 4, p. 351–7, ago. 2009.

ZHAO, J.-B.; LIAO, D.-H.; NISSEN, T. D. Animal models of pancreatitis: can it be translated to human pain study? **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 42, p. 7222–30, 14 nov. 2013.

ZHOU, M.-T. et al. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. **World journal of gastroenterology**, v. 16, n. 17, p. 2094–9, 2010.

ZHOU, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor antagonist (S,R)3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester attenuates inflammation and lung injury in rats with acute pancreatitis in pregnancy. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 5, p. 6576–6584, 2018.