



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

THIAGO ANDRADE RIBEIRO

**VITAMINA D3 (1,25(OH)2D3) EM SUA FORMA ATIVA REDUZ ALTERAÇÕES
PULMONARES INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAL SECUNDÁRIA A
PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS *SWISS***

FORTALEZA

2024

THIAGO ANDRADE RIBEIRO

VITAMINA D3 (1,25(OH)₂D₃) EM SUA FORMA ATIVA REDUZ ALTERAÇÕES
PULMONARES INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAL SECUNDÁRIA A PANCREATITE
AGUDA ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS *SWISS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

R372v Ribeiro, Thiago Andrade.
vitamina d3 (1,25(oh)2d3) em sua forma ativa reduz alterações pulmonares inflamatórias e funcional secundária a pancreatite aguda alcoólica em camundongos swiss / Thiago Andrade Ribeiro. – 2024.
63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

1. pancreatite aguda. 2. SDR. 3. vitamina D3. I. Título.

CDD 611

THIAGO ANDRADE RIBEIRO

VITAMINA D3 (1,25(OH)2D3) EM SUA FORMA ATIVA REDUZ ALTERAÇÕES
PULMONARES INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAL SECUNDÁRIA A PANCREATITE
AGUDA ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS *SWISS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Morfofuncionais.

Aprovada em: 08/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Thiago Meneses Araújo Leite Sales
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

A Deus.

Aos meus pais, Francisco e Maria das Graças.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais, Francisco e Maria das Graças, e irmãos, Adriano e João Paulo, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, pela orientação, estando comigo sempre me mostrando como seguir e me colocando cada vez mais no caminho, me mostrando qual seria meu voo, me guiando para a conclusão deste trabalho.

Ao Me. Paulo Roberto, que foi a pessoa que me acolheu no final da minha iniciação científica e foi meu coorientador, não no papel, sempre me ajudando e me guiando em todos os caminhos para a conclusão desse trabalho, serei sempre grato por tudo.

A Klayre e Lara, agradeço sempre por estarem no meu lado, escutando minhas reclamações, me aturando durante os dramas que acontecem, saibam que vocês sempre terão um lugar especial no meu coração.

A Maria de Fathima, Gessica e Myleide, agradeço por sempre estarem presente, me ajudando nos experimentos e sempre deixando o ambiente mais confortável e descontraído de se trabalhar.

Aos Ics do laboratório, Ananda, Antoniele, Ariele, Beatriz, Bruna, Débora e os demias, muito obrigado por cada ajuda que vocês deram.

Ao LEFFAG de forma geral, Álvaro, Carlos, Humberto, Ismael, Genilson e Thiago Meneses, e a todos os membros dele, muito obrigado por tudo.

Gostaria de agradecer ao Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará pelo suporte técnico.

Ao professor participante da banca Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Instituição Funcap, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“No! Try not! Do or do not, there is no try.”
(YODA, Master).

RESUMO

A pancreatite aguda (PA) desencadeia a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, em que 60% dos indivíduos desenvolvem uma lesão pulmonar aguda (LPA) e conseqüentemente a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), de patogenicidade não totalmente elucidada. A vitamina D3 possui atividade terapêutica, sendo utilizada em tratamento de LPA. Diante disso, o presente estudo buscou utilizar a forma ativa da vitamina D3 como possível agente anti-inflamatório na LPA decorrente PA alcoólica experimental. Foram utilizados camundongos *Swiss*, distribuídos em 6 grupos experimentais: Salina; EtOH/POA e EtOH/POA + vitamina D3 nas doses 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ via oral. Após a indução da PA, os animais foram anestesiados para análise de espirometria e em seguida eutanasiados para coleta de sangue e mensuração de α -amilase e lipase, coleta do lavado broncoalveolar (LBA) para contagem total e diferencial de leucócitos e a retirada do pâncreas e pulmão para análise histopatológica, de mieloperoxidase (MPO) e glutatona reduzida (GSH). Os dados obtidos destacaram a capacidade da vitamina D3 em reduzir ($p < 0,05$) o infiltrado de polimorfos nucleares e o espessamento alveolar em escores histológicos do pulmão em todas as doses testadas, exceto na de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ quando comparadas ao grupo EtOH/POA. Assim como níveis reduzidos ($p < 0,05$) de α -amilase nas doses de 0,3, 1 e 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e para lipase, com redução ($p < 0,05$) nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ quando comparadas ao grupo EtOH/POA. A atividade da MPO também foi reduzida ($p < 0,05$) no tecido pulmonar nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ quando ao grupo EtOH/POA. As análises de GSH do pulmão apresento um aumento ($p < 0,05$) nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ quando ao grupo EtOH/POA. O número de leucócitos totais no LBA indicou redução ($p < 0,05$) nas doses de 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, assim como a quantidade de macrófagos com o tratamento da vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ quando comparados ao grupo EtOH/POA ($p < 0,05$). Mediante os resultados, a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vitamina D3 foi escolhida para dar continuidade as análises citocinas e espirometria. Em relação as citocinas, a vitamina D3 foi capaz de diminuir a quantidade de proteínas de NF κ B e IL-1 β quando comparados ao grupo EtOH/POA ($p < 0,05$), já na espirometria, indicou um aumento ($p < 0,05$) no fluxo respiratório e frequência respiratória ao comparar com grupo EtOH/POA. Diante disso, foi possível observar a atividade terapêutica da vitamina D3 na LPA ocasionada pela PA alcoólica, ao reduzir níveis de enzimas pancreáticas, processos inflamatórios, oxidativos e danos funcionais.

Palavras-chave: pancreatite aguda; SDRA; vitamina d3.

ABSTRACT

VITAMIN D3 (1,25(OH)₂D₃) IN ITS ACTIVE FORM REDUCES INFLAMMATORY AND FUNCTIONAL PULMONARY CHANGES SECONDARY TO ACUTE ALCOHOLIC PANCREATITIS IN SWISS MICE

Acute pancreatitis (AP) triggers systemic inflammatory response syndrome, in which 60% of individuals develop acute lung injury (ALI) and consequently acute respiratory distress syndrome (ARDS), the pathogenesis of which is not fully understood. Vitamin D3 has therapeutic activity and is used in the treatment of ALI. Therefore, the present study sought to use the active form of vitamin D3 as a possible anti-inflammatory agent in ALI resulting from experimental alcoholic AP. Swiss mice were used and distributed into 6 experimental groups: Saline; EtOH/POA; and EtOH/POA + vitamin D3 at doses of 0.3, 1, 3, and 30 µg/kg orally. After induction of AP, the animals were anesthetized for spirometry analysis and then euthanized for blood collection and measurement of α-amylase and lipase, collection of bronchoalveolar lavage (BAL) for total and differential leukocyte counts, and removal of the pancreas and lung for histopathological analysis of myeloperoxidase (MPO) and reduced glutathione (GSH). The data obtained highlighted the ability of vitamin D3 to reduce ($p < 0.05$) the infiltration of nuclear polymorphs and alveolar thickening in lung histological scores at all doses tested, except at 0.3 µg/kg when compared to the EtOH/POA group. As well as reduced levels ($p < 0.05$) of α-amylase at doses of 0.3, 1 and 3 µg/kg and for lipase, with reduction ($p < 0.05$) at doses of 0.3, 1, 3 and 30 µg/kg when compared to the EtOH/POA group. MPO activity was also reduced ($p < 0.05$) in lung tissue at doses of 0.3, 1, 3 and 30 µg/kg when compared to the EtOH/POA group. Lung GSH analyses showed an increase ($p < 0.05$) at doses of 0.3, 1, 3 and 30 µg/kg when compared to the EtOH/POA group. The number of total leukocytes in BAL showed a reduction ($p < 0.05$) at doses of 1, 3 and 30 µg/kg, as well as the number of macrophages with vitamin D3 treatment at doses of 0.3, 1, 3 and 30 µg/kg when compared to the EtOH/POA group ($p < 0.05$). Based on the results, the dose of 1 µg/kg of vitamin D3 was chosen to continue the cytokine and spirometry analyses. Regarding cytokines, vitamin D3 was able to reduce the amount of NFκB and IL-1β proteins when compared to the EtOH/POA group ($p < 0.05$), while spirometry indicated an increase ($p < 0.05$) in respiratory flow and respiratory rate when compared to the EtOH/POA group. Therefore, it was possible to observe the therapeutic activity of vitamin D3 in ALI caused by alcoholic PA, by reducing levels of pancreatic enzymes, inflammatory and oxidative processes and functional damage.

Keywords: acute pancreatitis; ARDS; vitamin D3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pâncreas e suas estruturas	14
Figura 2 – Desencadeamento da Pancreatite	18
Figura 3 – Processo inflamatório no alvéolo	21
Figura 4 – Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA alcoólica experimental	36
Figura 5 – Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA alcoólica experimental	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Vitamina D3 reduz níveis séricos de α -amilase e lipase de camundongos submetidos a PA alcoólica	34
Gráfico 2 – Vitamina D3 limita a atividade da Mieloperoxidase no pulmão de animais submetidos a pancreatite alcoólica	38
Gráfico 3 – Avaliação Da Glutathiona Reduzida Em Animais Induzidos Com Pancreatite Aguda E Tratados Com A Vitamina D3	39
Gráfico 4 – Vitamina D3 Diminuiu os Leucócitos e Macrófagos no Lavado Bronco Alveolar de Camundongos com PA	40
Gráfico 5 – Vitamina D3 diminui os níveis de NF κ B E IL-1 β	42
Gráfico 6 – Vitamina D3 protege aspectos funcionais do pulmão	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escores histológicos do pâncreas de animais com PA e tratados com vitamina D3	36
Tabela 2 – Escores histológicos do pulmão de animais com PA e tratados com vitamina D3	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-DHC	7-deidrocolesterol
AINES	Anti-inflamatório não Esteroidal
AR	Artrite Reumatoide
CA	Células Acinar
CAMP	Peptídeo Antimicrobiano Catelicidina
CCR2	Receptor Da Quimiocina
CEUA	Comite de Ética de Uso de Animais
EEAG	Etil-Ésteres De Ácidos Graxos
FR	Frequência Respiratória
GSH	Glutationa Reduzida
HTAB	Brometo De Hexadeciltrimetilamônio
LBA	Lavado Broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeos
MerTK	Receptor Mer Tirosina Quinase
miRNA	Micro RNA
MO	Macrófago
MO ^A	Macrófago Alveolar
MO ^A 1	Macrófago Alveolar Tipo 1
MO ^A 2	Macrófago Alveolar Tipo 2
MO ^A 2a	Macrófago Alveolar Tipo 2 ^a
MO ^A 2b	Macrófago Alveolar Tipo 2b
MO ^A 2c	Macrófago Alveolar Tipo 2c
MPO	Mieloperoxidase
PA	Pancreatite Aguda
POA	Ácido Palmitoléico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SDMO	Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
STAT3	Transdutor De Sinal Ativador De Transcrição 3
TCA	Ácido Tri-Cloro-Acético

TGF	Fator De Crescimento Transformador
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Raio Ultravioleta
VDR	Receptor de Vitamina D

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
\pm	Mais ou Menos
γ	Gamma
$<$	Menor que
$>$	Maior que
©	Copyright
®	Marca Registrada
L	Litro
g	Gramma
μ	Micro
Kg	Quilograma
U	Unidade
s	Segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	PÂNCREAS	14
1.2	PANCREATITE	16
1.2.1	Modelo experimental da pancreatite aguda alcoólica	18
1.3	PANCREATITE & REPERCUSSÃO PULMONAR	20
1.4	TRATAMENTOS PARA A SDRA	22
1.5	PAPEL IMUNOMODULATÓRIO DA VITAMINA D3	23
32	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	27
4	MATERIAIS E METODOS	28
4.1	TIPO DE ESTUDO	28
4.2	LOCAL	28
4.3	ANIMAIS	28
4.4	PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM A VITAMINA D3	29
4.5	PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA ..	29
4.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PANCREÁTICO E PULMONAR	29
4.7	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE A-AMILASE & LIPASE	30
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	30
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	31
4.10	COLETA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	31
4.11	DETERMINAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS NO LBA	31
4.11.1	Avaliação diferencial de leucócitos do LBA	32
4.12	QUANTIFICAÇÃO DE NFκB E IL-1β POR WESTERN BLOT	32
4.13	ANÁLISE DA FUNÇÃO PULMONAR (ESPIROMETRIA)	32
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	34
5.1	VITAMINA D3 REDUZ NÍVEIS SÉRICOS DE A-AMILASE E LIPASE OCASIONADO PELA PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA	34
5.2	HISTOLOGIA DO PÂNCREAS E PULMÃO EM ANIMAIS INDUZIDOS	35

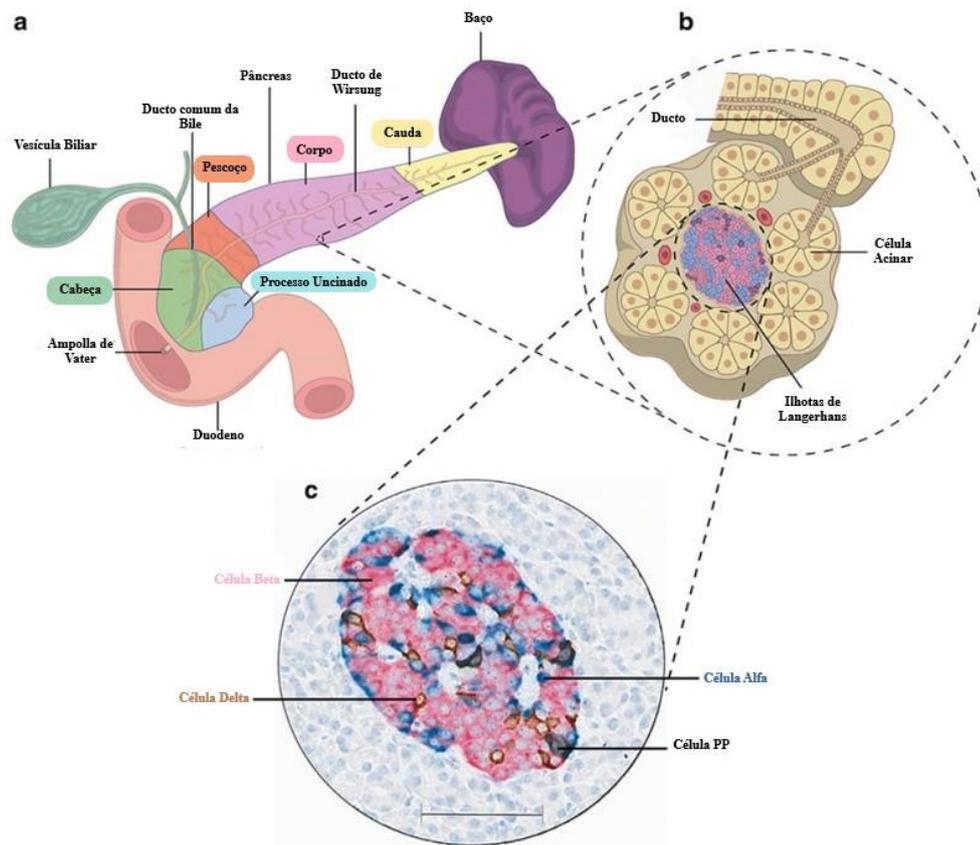
5.3	COM PA E TRATADOS COM VITAMINA D3 TRATAMENTO COM VITAMINA D3 ATENUA ATIVIDADE DA MPO NO TECIDO PULMONAR	38
5.4	AVALIAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM ANIMAIS INDUZIDOS COM PANCREATITE AGUDA E TRATADOS COM A VITAMINA D3	39
5.5	VITAMINA D3 DIMINUIU OS LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS NO LAVADO BRONCO ALVEOLAR DE CAMUNDONGOS COM PA	40
5.6	VITAMINA D3 DIMINUIU OS NÍVEIS DE NFκB E IL-1β NO PULMÃO....	41
5.7	VITAMINA D3 MELHOROU OS ASPECTOS FUNCIONAIS DO PULMÃO	43
6	DISCURSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	51
8	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS ANATOMOFUNCIONAIS DO PÂNCREAS

O pâncreas é um órgão glandular fundamental para a homeostase metabólica do organismo, ele está localizado na cavidade retroperitoneal superior do abdômen com dimensões entre 14 a 25cm, se dividindo anatomicamente em quatro partes, a região da cabeça, interliga ao duodeno; do pescoço e corpo, segmentos com a maior distribuição e a região da cauda, adjacente ao baço (Figura 1) (Atkinson *et al.*, 2020).

Figura 1: Pâncreas e suas estruturas.



Fonte: Adaptado de (Atkinson *et al.*, 2020).

Diagrama esquemático indicando o pâncreas, suas estruturas e principais células que o compõem. Em “a” divisões anatômicas do pâncreas: cabeça, pescoço, corpo e cauda, além dos órgãos que estão adjacentes. Em “b” o tecido pancreático, onde localiza-se o ducto pancreático, as células acinares e ilhota de *Langerhans*. Em “c” a histologia das ilhotas de *Langerhans*, com as principais células que as compõem, com destaque para as células beta coradas em rosa, células alfas coradas em azul, células delta coradas em marrom e células PP coradas em preto.

Dentre as principais estruturas que compõem o tecido pancreático, as ilhotas de *Langerhans* são as responsáveis por desempenhar funções endócrinas no organismo, atuando na regulação hormonal do sistema gastrointestinal (Shih; Wang; Sander, 2013) através de células como: alfa e beta, que produzem o glucagon e insulina, respectivamente, responsáveis principalmente pela regulação fisiológica da glicose; as células deltas produtoras de somatostatina, substância inibidora do hormônio do crescimento, da secreção de insulina e glucagon, da função exócrina pancreática bem como um potente inibidor da secreção ácida pelas células parietais do estômago; as células épsilon que produzem Ghrelina, hormônio responsável por regular o apetite e as células PP, responsáveis por produzirem e liberarem o polipeptídeo pancreático que participa de processos hipoglicêmicos, da estimulação do conteúdo gástrico e retardo do esvaziamento estomacal (Figura 1) (Atkinson *et al.*, 2020; Śliwińska-Mossoń; Marek; Milnerowicz, 2017).

As distintas funções realizadas pelo pâncreas ocorrem devido a sua morfologia e as estruturas celulares que o compõem, dando destaque a sua característica glandular que corresponde a sua porção exócrina e constitui 85% do tecido pancreático, denotando assim o papel principal exercido por esse órgão. A função exócrina pancreática atua a partir da sintetização de enzimas digestivas, por meio das células acinares (CAs) e uma rede de túbulos ductais que transportam o conteúdo do fluido pancreático para a porção inicial do duodeno, o que permite o auxílio no processo de degradação do conteúdo alimentar e inativação do pH gástrico (Mayerle *et al.*, 2019).

As CAs são consideradas as predominantes do tecido pancreático, essas células apresentam formatos esféricos, tubulares ou irregulares e suas funções são definidas pela produção de enzimas digestivas nos ribossomos do retículo endoplasmático, seguido do armazenamento em formas inativas, grânulos zigomáticos, na região apical das CAs onde posteriormente, após estímulos na membrana basolateral, essas substâncias são liberadas para os ductos acessórios pancreáticos percorrendo todo ramo até o ducto principal que adentra a porção inicial do duodeno, no qual é referenciado como o órgão apto fisiologicamente para início das atividades exercidas por essas enzimas (Damasceno, 2019; Souza *et al.*, 2016).

As funções secretoras das CAs são reguladas por vários hormônios, em destaque a secretina e colecistocinina que são liberados por células encontradas no revestimento da mucosa duodenal durante o processo de ingestão alimentar, estimulando o pâncreas a produzir e liberar grandes quantidades de água, bicarbonato e enzimas digestivas ou através do sistema neuroglial residente, à medida que o alimento adentra o duodeno (Mayerle *et al.*, 2019).

O fluido pancreático é composto majoritariamente por enzimas digestivas provenientes

das CAs, em destaque para a tripsina, sintetizada na forma de tripsinogênio, que atua em conjunto com carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxirribonucleases em ações proteolíticas, facilitando a digestão de macros nutrientes; assim como também para a amilase, que tem como atribuição a quebrar de açúcares de cadeias complexas e a lipase, que atua com as esterases e fosfolipases na degradação de lipídeos por meio da separação dos ácidos graxos em glicerol. Essa composição enzimática permitiu que o processo de degradação do conteúdo alimentar seja bem-sucedido e a absorção de nutrientes ocorra de forma regular (Bharmal *et al.*, 2017; Damasceno, 2019).

Além das ilhotas de *Langerhans* e as CAs, o tecido pancreático contém também células imunes residentes, como macrófagos, células dendríticas e um grande complexo vascular que mantém a arquitetura tecidual do órgão, é evidenciado também a participação das células estelares, que são as responsáveis pela manutenção da matriz extracelular (Shih; Wang; Sander, 2013; Zheng *et al.*, 2013).

Contudo, devido a complexa funcionalidade exercida pelo pâncreas na manutenção do metabolismo, esse órgão pode vir a sofrer algumas patologias que levam a alterações metabólicas no organismo, como o Diabetes Mellitus, o câncer pancreático, doenças autoimunes e a pancreatite, que representa o principal processo inflamatório que acomete o tecido pancreático (Garber *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2003).

1.2 PANCREATITE

Caracterizada como o principal distúrbio inflamatório que acomete o tecido pancreático de forma aguda ou crônico, a pancreatite é resultado de alterações fisiológicas que levam a autofagia tecidual, essa patologia possui caráter multifatorial podendo ocorrer por pré-disposição genética, através da dieta (diretamente relacionado ao consumo excessivo do álcool), doenças autoimunes, cálculos na vesícula biliar entre outros fatores (Wang *et al.*, 2009).

A forma aguda da pancreatite é considerada uma condição patológica comum, que pode acometer o pâncreas de forma leve e recorrente, mas que devido alta capacidade regenerativa do tecido pancreático o organismo se torna autossuficiente na recuperação, no entanto a sua forma grave pode vir a levar outras complicações que geralmente estão associadas com uma alta taxa de mortalidade (Abdulla *et al.*, 2011).

A pancreatite aguda (PA) é classificada como uma doença que apresenta muitas variações clínicas, com um diagnóstico direcionado somente quando o paciente apresenta fortes dores abdominais (principal sintoma), influenciando diretamente na gravidade da doença e no

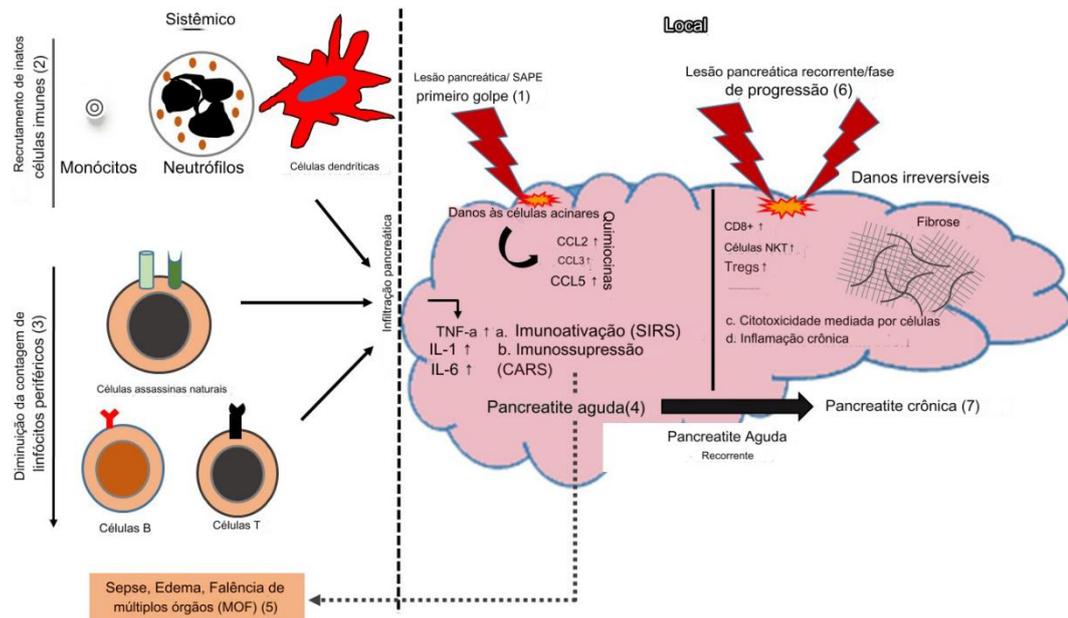
seu tratamento que atualmente se baseia no alívio dos sintomas e atenuação do processo inflamatório de modo geral, utilizando para isso medicamentos das classes dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e em última instância opioides. Todos esses aspectos impactam também nos dados epidemiológicos para internações, diagnóstico e mortalidade da PA (Bollen, 2016; Leite, 2019).

A incidência da pancreatite varia de 50 a 80 casos por ano a cada 100.000 habitantes, (SOUZA, *et al.*, 2016) em que segundo dados epidemiológicos a PA ocupa o 21º lugar em internações hospitalares, tendo em vista que esses pacientes já apresentam a forma grave da doença e sua morbimortalidade atinge cerca de 25-45% dos casos de pancreatite (Garber *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2016), com a dor representando o sintoma mais comum, presente em cerca de 90% dos pacientes, além dos níveis de amilase e lipase desses indivíduos estarem três vezes acima do valor de normalidade (Bhardwaj *et al.*, 2009).

A literatura e os dados epidemiológicos indicam que a litíase biliar e o consumo excessivo de álcool representam cerca de 80% dos casos de pancreatite, em que a fisiopatologia envolvendo as alterações causadas pela litíase biliar ao microambiente pancreático é descrita por ocorrer através de uma obstrução transitória no ducto pancreático impedido assim a liberação das enzimas digestivas no duodeno e o conseqüente acúmulo dentro dos ductos e nas CAs, propiciando uma autofagia do pâncreas (Carvalho, 2018; Habtezion; Gukovskaya; Pandol, 2019).

A correlação entre o álcool e a PA é caracterizada pelo seu consumo excessivo, o que excede a capacidade da metabolização dessa substância pelo fígado, permitindo que esse processo seja realizado por outros órgãos como o estômago, intestino delgado e o pâncreas em específico pelas células acinares e estelares (Apte; Pirola; Wilson, 2010; Jung; Namkoong, 2014). Para o processo de metabolismo do álcool as CAs utilizam de duas vias, a oxidativa onde o álcool é convertido pela enzima álcool desidrogenase em acetaldeído para ser eliminado pelo organismo, contudo esse processo é considerado danoso ao pâncreas por gerar espécie reativa de oxigênio, e a via não oxidativa, considerada a principal utilizada pelo pâncreas para eliminação do álcool e que utiliza de uma série de enzimas chamadas de etil-ésteres de ácidos graxos (EEAG) para conjugação do álcool a ácidos graxos, que posteriormente são degradados na mitocôndria através da β -oxidação ou nos peroxissomos e retículo endoplasmático, de todo modo esse processo é referido por induzir uma elevação do cálcio intracelular e a conseqüente desregulação e coalizão dos grânulos zigomáticos com os lisossomos, induzindo uma ativação prematura das enzimas pancreáticas no próprio tecido e uma autodigestão do pâncreas (Bhatia *et al.*, 2020; Carvalho, 2018; Criddle *et al.*, 2007).

Figura 2: Desencadeamento da pancreatite.



Fonte: Adaptado de (Bhatia *et al.*, 2020).

Devido à alta taxa de mortalidade e os aspectos fisiológicos e patológicos que envolvem o funcionamento do pâncreas, além da falta do diagnóstico precoce e tratamento direcionado para a pancreatite, diversos pesquisadores ao longo dos anos desenvolveram e utilizam de modelos experimentais para mimetizar o processo inflamatório da pancreatite e os possíveis mecanismos por trás da sua instalação e desenvolvimento.

1.2.1 Modelo experimental da Pancreatite Aguda alcoólica

Os modelos de PA agudo variam muito das formas de indução, onde esses modelos sempre buscam trazer a PA em sua forma grave, tendo modelos consolidados como o modelo de ceruleína. A ceruleína é um análogo da colecistocinina (CCK), um hormônio peptídico que estimula a secreção de enzimas digestivas pelo pâncreas. O uso da ceruleína em doses elevadas ou repetidas induz uma resposta exagerada, levando à pancreatite aguda, se ligando a receptores específicos no pâncreas e na vesícula biliar gerando a autofagia do tecido, por meio da liberação excessiva das enzimas pancreáticas, que por sua vez não são ativadas da forma correta e acabam ativando vias inflamatórias. Este modelo simula os aspectos iniciais e moderados da doença, incluindo edema pancreático, infiltração de células inflamatórias e ativação intrapancreática de

enzimas digestivas. (JANCSÓ; SAHIN-TÓTH, 2022; LERCH; GORELICK, 2013)

Outro modelo bastante utilizado é o modelo de ligadura do ducto pancreático, onde esses modelos são amplamente utilizados para simular a pancreatite associada a obstruções do ducto pancreático, como as causadas por cálculos biliares ou tumores que bloqueiam o fluxo de secreções pancreáticas. Esse modelo se baseia na indução mecânica de uma obstrução no ducto pancreático principal, resultando na retenção de enzimas pancreáticas dentro do pâncreas, ativação enzimática precoce e danos ao tecido pancreático, imitando de maneira mais próxima os mecanismos de lesão vistos em formas humanas de pancreatite biliar. A obstrução ductal é realizada por métodos cirúrgicos, como a ligadura do ducto pancreático. Esta técnica bloqueia o fluxo normal de enzimas digestivas, o que resulta na retenção dessas enzimas dentro das células acinares pancreáticas. A incapacidade das enzimas de serem secretadas adequadamente leva à ativação intrapancreática, que inicia um processo de autodigestão do tecido pancreático, gerando um quadro similar de litíase biliar que acontece no ser humano (Cruciani, 2007; Lankisch; Apte; Banks, 2015; Lerch; Gorelick, 2013).

Contudo recentemente surgiu um novo modelo de pancreatite, modelo o qual se baseia no consumo excessivo de álcool, que nos últimos anos causou um aumento nos casos de pancreatite. A indução da PA por meio do etanol é considerada um modelo recente, que ganhou destaque devido a um maior consumo de álcool nas últimas décadas, o que se correlacionou com uma maior incidência de PA (Huang *et al.*, 2014). Porém, o entendimento da fisiopatologia da PA alcoólica ainda não é totalmente compreendido, tendo em vista que o álcool sozinho não é considerado um agente fidedigno para a indução da pancreatite experimental, denotando a necessidade de utilizá-lo associado a outras substâncias como lipídeos.

A associação entre a ingestão lipídeos e consumo excessivo do álcool possuem relevância fundamentada por estudos epidemiológicos, que demonstram que dietas com consumo excessivo de lipídeos podem ter relação com casos de pancreatite, atualmente se sabe que uma via metabólica comum é compartilhada por essas duas substâncias o que pode esclarecer os mecanismos fisiopatológico pelo qual o álcool causa danos ao pâncreas (Carvalho, 2018; Criddle, 2015).

Um estudo realizado por Huang e colaboradores propôs um modelo *in vivo* que utiliza o etanol associado a metabolito direto da via não oxidativa, o ácido palmitoléico (POA), como um complexo de agentes etiológicos para a indução da PA alcoólica. Esse trabalho demonstrou através de injeções intraperitoneais do etanol associado ao POA, alterações significativas com características de pancreatite, com o aumento de amilase e lipase séricas e danos no tecido pancreático com aspectos necróticos, além disso esse estudo destacou que os mecanismos

envolvidos na instalação desse processo inflamatório no tecido pancreático ocorrem devido a altos níveis de EEAG, o que gera consequente elevação nos níveis de cálcio citoplasmático nas CAs, além de uma ativação prematura dos grânulos de zimogênios, ocasionado a necrose dessas células e uma autofagia do tecido pancreático (Criddle, 2015; Girão, 2017).

Vários outros estudos demonstraram também que a intensidade na gravidade das manifestações clínicas da pancreatite ocorre devido ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), caracterizada por apresentar uma tempestade de citocinas na corrente sanguínea que pode gerar alterações em outros órgãos através da síndrome da disfunção múltipla de órgão (SDMO), em que os efeitos inflamatórios dessa patologia atingem consideravelmente o sistema gastrointestinal, assim como também são observados efeitos deletérios a órgão distantes como o pulmão, que por ser altamente vascularizado acaba sendo suscetível a efeitos deletérios (Roberts *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2017). Huang e colaboradores (2014) demonstraram que no modelo de pancreatite aguda alcoólica, o pulmão apresentava alterações histopatológicas condizendo com uma lesão pulmonar que pode ser relacionada a SDRA.

1.3 PANCREATITE & REPERCUSSÃO PULMONAR

A maioria dos pacientes com PA sofre de uma doença leve e autolimitada, contudo 15-20% dos indivíduos desenvolvem a sua forma grave, com posterior desencadeamento da SRIS e, conseqüentemente, SDMO em que a taxa mortalidade durante as duas primeiras semanas é devido à falência sistemática de órgãos, e após esse período é resultado de infecção secundária do pâncreas ou necrose peripancreática (Fukui, 2016; Zaheer *et al.*, 2013).

De fato, a SRIS é um dos principais processo patológico subjacente à pancreatite aguda grave de grande importância, sendo essa condição responsável por desencadear perturbações a sistemas fisiológicos, com quadros na maioria dos pacientes com PA de hipoxemia leve à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), gerando assim uma lesão pulmonar aguda (LPA) (Ge *et al.*, 2020; Gea-Sorlí *et al.*, 2011), que acomete cerca de 60% dos indivíduos e é citada como a responsável por 60% das mortes na primeira semana da doença (Chooklin, 2009; Muhs *et al.*, 2003).

A SDRA não é considerada uma doença primária, podendo ser resultado de uma lesão pulmonar direta causada, por exemplo, pela pneumonia, a aspiração do conteúdo gástrico, assim como a lesão por inalação, podendo ser causada por uma lesão pulmonar de característica indireta como, por exemplo, a sepse, COVID-19, o trauma grave com choque, e a própria

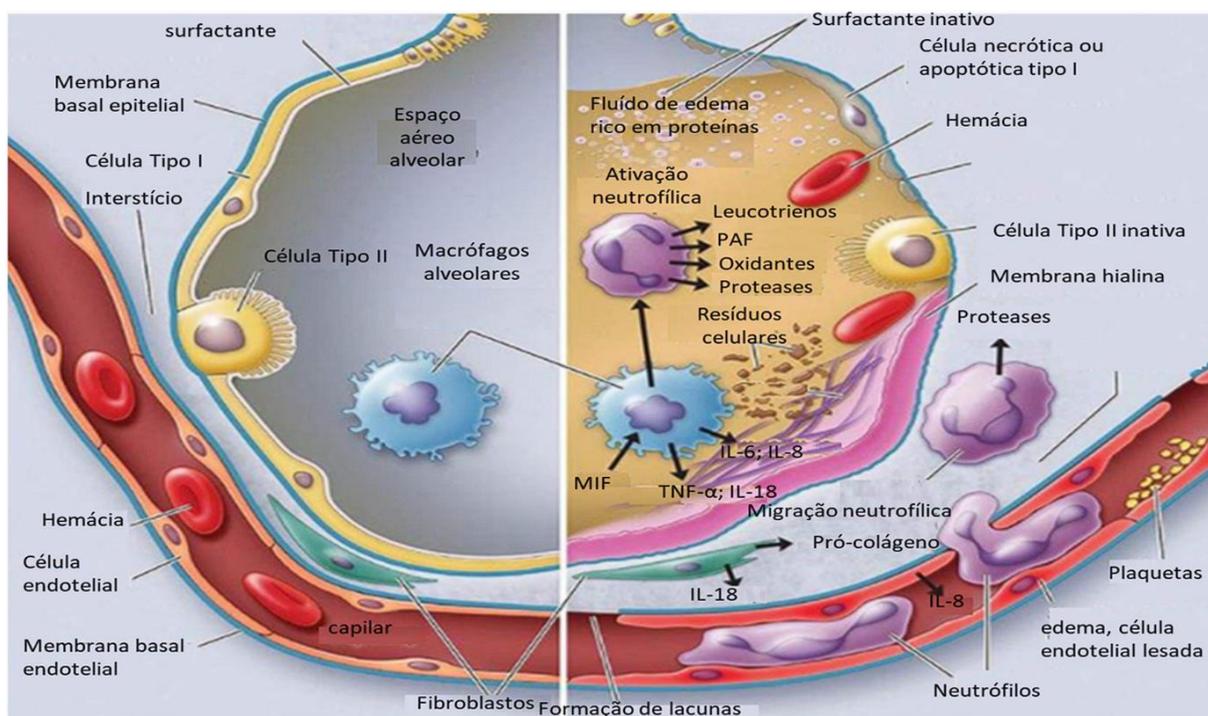
pancreatite aguda (Dushianthan *et al.*, 2011; Matthay; Ware; Zimmerman, 2012; Shah; Rana, 2020). Essa síndrome é caracterizada por apresentar edema pulmonar não hidrostático, dano alveolar difuso e intenso processo inflamatório o que resulta no comprometimento variável da ventilação pulmonar, inadequada perfusão e hipoxemia grave, ocasionando aos pacientes acometidos pela SDRA a necessidade frequente de ventilação mecânica e uma piora no prognóstico (Dushianthan *et al.*, 2011). Na pancreatite aguda alcoólica experimental, Carvalho e colaboradores demonstraram que a lesão pulmonar é causada por processo inflamatório, gerando em uma diminuição na capacidade respiratório e também na diminuição da contração do diafragma, apresentando um aumento de infiltrado de células inflamatórias no pulmão, e mudando o perfil fenotípico das células residentes (Carvalho, 2018).

Dados epidemiológicos evidenciam que a SDRA varia de 1,5 a 79 casos a cada 100.000 habitantes, onde os países europeus relatam uma incidência menor do que os EUA. Em relação ao território brasileiro, estudos constataam que a taxa de incidência varia de 1,8 a 31 casos a cada 100.000 habitantes (Confalonieri; Salton; Fabiano, 2017), tendo em vista que esses relatos epidemiológicos apontam como uma das principais causas da SDRA a PA na qual não possui uma patogênese totalmente compreendida, contudo acreditasse que durante o desenvolvimento e instalação da pancreatite, ocorra liberação de diversos mediadores inflamatórios resultando na SRIS, levando a um quadro característico da SDRA (Shah; Rana, 2020).

O acúmulo de mediadores e células inflamatórias no tecido pulmonar representam as principais características que indicam injúrias as células endoteliais vasculares, epiteliais e alveolares no pulmão, esse processo é responsável também por acarretar uma destruição na barreira pulmonar e no lúmen dos alvéolos, dificultando assim a troca de gases. Destaca-se ainda, o aumento da permeabilidade vascular que acarreta um transbordamento de fluido rico em proteínas que chega aos alvéolos e interstício pulmonar, causando edema e lesão alveolar difusa podendo causar inativação do surfactante, gerando assim uma LPA (Figura 2) (Ge *et al.*, 2020).

Entre os principais mediadores citados nas causas da SDRA estão citocinas proinflamatórias, com destaque para o TNF- α , MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, pela quimiotaxia de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos para o tecido pulmonar, e promovem uma lesão exacerbada no pulmão, com apoptose e necrose de células epiteliais (Elder *et al.*, 2012).

Figura 3: Processo inflamatório no alvéolo.



Fonte: Adaptado de (Carvalho, 2018).

Atualmente a patogenicidade da SDRA e consequentemente a LPA advinda da pancreatite aguda não é totalmente elucidada, mas acredita-se que durante a instalação e desenvolvimento da PA ocorra a liberação de diversos mediadores inflamatórios e ativação de células imunes, como neutrófilos e macrófagos (MOs), desencadeando um quadro de SRIS e consequente alterações ao tecido pulmonar com característica de SDRA (Carvalho, 2018; Zheng *et al.*, 2013).

1.4 TRATAMENTOS PARA LESÃO PULMONAR AGUDA

Atualmente não existem tratamentos específicos para a LPA, onde a principal forma de tratamento utilizados são os glicocorticoides, que são hormônios esteroidais atuantes diretamente na supressão de genes inflamatórios, indução de apoptose, inibição de citocinas e inibição de migração de células pró inflamatórias (Lewis *et al.*, 2019; Torres; Insuela; Carvalho, 2012).

Além dos glicocorticoides, outras formas de tratamento são utilizadas como vasodilatadores inalatórios, bloqueadores neuromusculares e a ventilação mecânica, essa última sendo a principal responsável pela melhora na capacidade respiratória, contudo esses métodos

são comumente associados com o desenvolvimento de fibrose pulmonar, gerando assim um dano irreversível ao tecido pulmonar (CABRERA-BENITEZ *et al.*, 2014).

Com isso, novas terapias são constantemente implementadas, com o objetivo de melhorar a função pulmonar e diminuir os danos causados pela SDRA, dentre as novas terapias está a utilização de exossomos, que consistem em vesículas formadas por complexos proteicos, provenientes de células troncos, onde são amplamente utilizados para o tratamento de acne, estímulo para a produção de colágeno e entre outras coisas. Onde estudos mostram que os exossomos podem potencialmente ajudar no tratamento da SDRA, através da transferência de micro RNA (miRNA) e regulação da função mitocondrial (LIU; XIAO; XIE, 2022).

Diante disso, novas formas de tratamento para a SDRA são de suma importância, onde já foi visto o potencial uso de substâncias endógenas para o tratamento de SDRA, abrindo assim portas para a utilização da vitamina D3, que vem cada vez mais se mostrando o seu potencial uso terapêutico.

1.5 PAPEL IMUNOMODULATÓRIO DA VITAMINA D3

A vitamina D3 é considerada uma substância nutriente essencial para a regulação da fisiologia osteomineral, em especial do metabolismo do cálcio, sua obtenção ocorre em torno de 20% através da ingestão dietética e outros 80% é produzido pela pele a partir de um composto precursor denominado 7-deidrocolesterol (7-DHC), que após exposição dos raios ultravioletas produz a forma ativa da vitamina D3, a $1\alpha,25$ -diidroxivitaminad3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ou calcitriol, sendo essa considerada um hormônio esteroide integrante do sistema endócrino (CASTRO, 2011; SASSI; TAMONE; D'AMELIO, 2018).

Os efeitos biológicos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são mediados pelo receptor de vitamina D3 (VDR), um fator de transcrição que pertence à família de receptores hormonais nucleares expressos em diversas células, principalmente nas células imunes, desempenhando um papel fundamental na regulação do metabolismo do cálcio e fósforo por meio do controle dos processos de absorção intestinal e reabsorção renal desses íons, mantendo-os em concentrações plasmáticas suficientes para assegurar a adequada mineralização e o crescimento ósseo em todas as etapas da vida. Entretanto, a quase universal distribuição do VDR nas células do organismo humano e a presença da CYP27B1, que é o gene que codifica a vitamina D em sua forma ativa, em vários tipos celulares mostram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ está envolvida em uma ampla gama de funções envolvendo a homeostase sistêmica (VANHERWEGEN; GYSEMANS; MATHIEU, 2017).

Várias células envolvidas na função imunológica expressam VDR e CYP27B1, o que sugere que a forma ativa da vitamina D3 é capaz de modular as células imunes em diferentes níveis. As primeiras atividades imunoreguladora da vitamina D3 foram descritas no tratamento de doenças causadas por micobactérias, como tuberculose e hanseníase, nas quais se observou um aumento da produção de defensinas tipo 2 e peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) por queratinócitos e macrófagos aumentando a atividade antimicrobiana, além disso foi evidenciado também um aumento na quimiotaxia, autofagia e fusão fagolisossomal de células imunes inatas (HANSDOTTIR; MONICK, 2011; SASSI; TAMONE; D'AMELIO, 2018).

Os VDR ficam localizados na membrana celular e no núcleo, sendo responsável por regular algumas vias de sinalização, as quais em sua maioria estão correlacionadas com inflamação e crescimento tumoral. A vitamina D juntamente com a citocina interferon gamma (IFN- γ) são responsáveis por grande parte da ativação de macrófagos, considerando assim além de um modulador de células imunes também um ativador de macrófagos residentes (DEB; SAKHARKAR, 2019; FORNO *et al.*, 2020).

Relatos sobre o importante papel da vitamina D3 sobre o sistema imunológico do pulmão, assim como nas doenças respiratórias foram descritos por Adams e colaboradores (1983) ao demonstrarem que os MO de pacientes com sarcoidose converteram a forma inativa da vitamina D3 em ativa, enquanto os MO de pacientes com fibrose pulmonar idiopática não reproduziram essa atividade, evidenciando que os MO de indivíduos normais não expressam constitutivamente 1 α -hidroxilase, enzima responsável por converter a vitamina D3 em sua forma ativa (ADAMS *et al.*, 1983; LIU *et al.*, 2018; REICHELTL *et al.*, 1987).

Um estudo experimental evidenciou que ao administrar 1,25(OH) $_2$ D $_3$ simultaneamente com fatores estimulante de processos inflamatórios, como lipopolissacarídeos (LPS) e TNF- α , em cultura de macrófagos derivados do plasma de pacientes saudáveis, uma redução das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, além da redução da expressão de marcadores de macrófagos tipo M1, subtipo responsável por gerar processo inflamatório (DI ROSA *et al.*, 2012). Um outro estudo mais recente sugeriu que a possível utilização da vitamina D3 poderia ser um mediador influente no tratamento do COVID 19 (FERNANDES *et al.*, 2022; MALAGUARNERA, 2020).

Pacientes infectados com SARS-CoV2 apresentam níveis séricos mais elevados de proteína C reativa, dímero D e citocinas, incluindo IL-6, IL-1, TNF- α , IL-2, IL-8, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IP10, MCP1 e MIP1 (ou CCL3) que facilita o agravamento da patologia. Evidenciado também a infiltração maciça de neutrófilos e macrófagos nos pulmões resultando em lesões com formação de membranas hialinas e espessamento da parede alveolar. Esse estudo

sugere então como possível mediador a utilização da 1,25(OH)₂D₃ na modulação do fenótipo dos macrófagos alveolares para um perfil M2, os quais são citados por inibir a inflamação provocando respostas imunes tipo Th2, além de possibilitar o aumento da fagocitose de células infectadas e restos celulares apoptóticos (FERNANDES *et al.*, 2022; MALAGUARNERA, 2020).

Além disso, estudos mostraram um papel importante da vitamina D sobre a fibrose pulmonar, onde através da inibição do TGF- β , fator importante para o desenvolvimento da fibrose pulmonar, responsável por causar danos irreversíveis ao pulmão, diminuindo função pulmonar e a capacidade respiratória (LIN *et al.*, 2023; MA; PENG, 2019).

Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar o possível efeito da Vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) sobre as alterações pulmonares inflamatórias e funcionais decorrente a pancreatite aguda alcoólica.

2 JUSTIFICATIVA

A pancreatite é uma doença com altos índices de internações hospitalares, considerada um problema de saúde, social e econômico de grande relevância que precisa de mais atenção. A PA geralmente apresenta-se como uma doença leve e autolimitada, contudo aproximadamente 20% dos pacientes desenvolvem a forma grave dessa doença, que é caracterizada pelo desenvolvimento da SRIS, onde dados evidenciaram que nos meses de fevereiro de 2016 a novembro de 2021 foram registradas mais de 190 mil internações em decorrência da PA, que resultaram em mais de 10 mil óbitos no país, sendo a maior incidência na região sudeste, cerca de 48% dos óbitos e 49% de internações (Brasil, 2022), onde 60% dos casos de pancreatite estão correlacionados com o acometimento do pulmão e desenvolvendo a SDRA, causando um aumento na taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes (Ge *et al.*, 2020; Criddle *et al.*, 2015). O acometimento pulmonar segundo a literatura ocorre devido a liberação de mediadores inflamatórios, em decorrência da PA e instalação da SRIS, o que causa alterações no microambiente pulmonar possibilitando assim o desenvolvimento da SDRA, processo inflamatório no qual é caracterizado pela presença de células imunes como mediadores dessa doença. Estudos destacaram que um dos perfis celulares mais presente no desenvolvimento durante o desenvolvimento da PA são os macrófagos alveolares, que são células que apresentam subtipos diferentes no pulmão, por serem células capazes de se adaptar para o recrutamento de outras células da imunidade, por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias, desempenhando principalmente o papel da regeneração tecidual e no controle da resposta imunológica (Carvalho, 2018; Song *et al.*, 2020). Visando isso, esse estudo pretende utilizar a forma ativa da vitamina D3 (1,25(OH)2D3) como hormônio anti-inflamatória, podendo atuar como nova forma de tratamento para a LPA advinda da PA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da forma ativa da Vitamina D3 (1,25(OH)₂D₃) sobre as alterações pulmonares inflamatórias e funcionais decorrente a pancreatite aguda alcoólica em camundongos *Swiss*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar aspectos histopatológicos do tecido pancreático e pulmonar de camundongos submetidos ao protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental com tratamento da vitamina D3 e seus respectivos controles;
- Analisar aspectos bioquímicos através da mensuração das enzimas pancreáticas (Amilase, lipase) no plasma dos camundongos submetidos ao protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental com tratamento da vitamina D3 e seus respectivos controles;
- Mensurar a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no pulmão dos camundongos submetidos ao protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental com tratamento da vitamina D3 e seus respectivos controles;
- Determinar a atividade da Glutationa Reduzida (GSH), no pulmão dos camundongos salina e submetidos ao protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental com tratamento da vitamina D3 e seus respectivos controles;
- Verificar o infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos submetidos ao protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental;
- Quantificar NFκB e IL-1β por meio da técnica de Western Blot, pulmão dos camundongos salina e submetidos ao protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental com tratamento da vitamina D3 e seus respectivos controles;
- Investigar *in vivo* os aspectos funcionais respiratórios através da espirometria de camundongos após a administração da vitamina D3 durante o protocolo da pancreatite aguda alcoólica experimental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo possui caráter experimental, em que para seu desenvolvimento foi utilizado um n de oito animais por grupo necessários para obtenção de resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05^*$). Esses animais foram divididos em 6 grupos: Grupo 1 - Salina (Controle negativo, animal normal, seguido pela administração de salina intraperitoneal), Grupo 2 - Etanol/POA (controle positivo para pancreatite, seguido de administração de Etanol/POA intraperitoneal), Grupo 3 - Etanol/POA e a dose $0,3\mu\text{g/Kg}$ de vitamina d3 (tratamento realizados nos tempos de 48h, 24h e 1h antes da indução da PA com administração de Etanol/POA intraperitoneal) Grupo 4 - Etanol/POA e a dose $1\mu\text{g/Kg}$ de vitamina d3 (tratamento realizados nos tempos de 48h, 24h e 1h antes da indução da PA com administração de Etanol/POA intraperitoneal) Grupo 5 - Etanol/POA e a dose $3\mu\text{g/Kg}$ de vitamina d3 (tratamento realizados nos tempos de 48h, 24h e 1h antes da indução da PA com administração de Etanol/POA intraperitoneal) Grupo 6 - Etanol/POA e a dose $30\mu\text{g/Kg}$ de vitamina d3 (tratamento realizados nos tempos de 48h, 24h e 1h antes da indução da PA com administração de Etanol/POA intraperitoneal).

4.2 LOCAL

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinais (LEFFAG) – UFC, no período de 2023.1 a 2024.1.

4.3 ANIMAIS

Para realização desse estudo foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos com peso entre 25 e 30 gramas, advindos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura controlada, com enriquecimento ambiental, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão e água a vontade. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os Padrões do uso de Animais de Laboratório da UFC, aprovadas na Comissão de Ética no Uso de Animais sobre o projeto guarda-chuva nº 3271010621.

4.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM A VITAMINA D3

Os animais foram divididos em 4 grupos, pré-tratados com a vitamina D3 (1,25(OH)2D3) nos tempos de 48, 24, 1 hora antes da indução da pancreatite aguda, por via oral, nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 µg/Kg, após o 1 hora do último tratamento os animais foram induzidos com a PA e posteriormente eutanasiados.

4.5 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA

Os animais foram divididos em seis grupos, em que o primeiro grupo recebeu administração de solução salina 0,9% (controle) e o segundo grupo a administração ácido palmitoléico (POA), 150 mg/Kg, diluído em etanol (2:3), e os demais grupos receberam a administração ácido palmitoléico (POA), 150 mg/Kg, diluído em etanol (2:3) com os tratamentos com vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30µg/Kg. Todas as aplicações ocorreram por via intraperitoneal (i.p), perfazendo um volume total de 250µL, com duas administrações durante um intervalo de 1 hora entre elas (Huang *et al.*, 2014). Após 24 horas do estabelecimento da pancreatite aguda seguindo protocolo descrito por Huang e colaboradores (2014), os animais foram anestesiados e submetidos a análises funcionais do pulmão, a coleta de sangue e em seguida a eutanásia por meio da laparotomia e secção da veia cava inferior, logo após foi coletado o lavado broncoalveolar dos animais e a retirada do pâncreas e do pulmão para avaliações histopatológicas.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PANCREÁTICO E PULMONAR

Após 24 horas do estabelecimento do protocolo de PA, o pâncreas e o pulmão (lobo direito) dos animais foram retirados e fixado em formol a 10%, decorridas 24 horas os tecidos foram retirados do formol e colocados em solução de álcool 70%. Logo após a fixação e preservação dos tecidos, esses foram postos em parafina por métodos padronizados e cortados em secções de 4µm através de um micrótomo e posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE).

As alterações morfológicas características de pancreatite como edema, infiltração de células inflamatória e necrose foram avaliadas através da tabela de escores padronizados e que possui diferenças quanto ao grau de alteração, determinando os escores de 0 a 3 (0= ausente, 1 = alteração interlobular, 2= alteração interlobular e moderada alteração intralobular, e 3 =

alteração interlobular e severa alteração intralobular) (Wildi *et al.*, 2007). Assim como as alterações morfológicas pulmonares em avaliações como: edema alveolar, infiltração de polimorfonucleares e espessamento alveolar, em que os escores considerados serão de 0 a 3, sendo 9 o escore máximo (Gultekin *et al.*, 2007). Os dados foram avaliados sob microscopia, em um estudo cego realizado por um histopatologista experiente.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE A-AMILASE & LIPASE

As análises bioquímicas de α -amilase e lipase foram realizadas a partir do sangue coletado dos animais, seguindo as recomendações propostas pelos kits da InterKit (Referência 10377390188) para α -Amilase, e LABTEST (Referência 107) para lipase. Onde o sangue foi centrifugado, retirado o plasma e pipetado 10 μ L em uma placa de 96 poços e acrescentado 190 μ L do reagente presente no kit, posteriormente as aquisições dos dados foram realizadas em um fluorímetro (Fluorstar Optima), nos intervalos de 0 e 5 minutos.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

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

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Para análise da concentração de GSH, amostras de pulmão foram coletadas, maceradas com um homogeneizador de tecidos em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Sigma Aldrich, EUA) a 0,02 M na proporção de 500µL de solução para 50mg de tecido. Em seguida, foi transferido o volume de 40 µL do homogenado para um tubo eppendorf, no qual foi adicionada água destilada (50 µL) e 10 µL de ácido tri-cloro-acético (TCA, Sigma Aldrich, EUA) 50%. A mistura foi centrifugada (5000 rpm, 20 min, 4°C). Foram retirados 60 µL do sobrenadante e transferidos para a placa de 96 poços. Em seguida foi feita uma mistura de 25mL tampão-Tris (0,4 M, pH 8,9) e 650 µL ácido 5,5-ditiolbis (2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma Aldrich, EUA) diluído em metanol (Vetec, Brasil, 0,01M). Em seguida 100 µL dessa solução foi pipetada na placa de 96 poços utilizando uma pipeta multicanal. Logo a seguir foi realizada a leitura em espectrofotômetro (BMG Labtech, Espanha) a 412 nm. Os dados foram expressos em ug de GSH/g de tecido (Takatori, 1975).

4.10 COLETA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

A coleta do LBA foi realizada com o objetivo de se obter o conteúdo e as células presentes no espaço alveolar. Após 24h da indução da PA, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e em seguida ocorreu a exposição da traqueia e uma pequena abertura para canulação com cateter de polipropileno de 1,7 mm, e o lavado foi realizado através da injeção de quatro alíquotas de 0,5ml de tampão salina-fosfato estéril (PBS 1X), injetadas e recolhidas 4 vezes, obtendo-se aproximadamente 2,0ml de volume final, que foi então centrifugado à 2.000rpm por 10 minutos a 4 °C para obtenção do pellet de células que foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos (Maxeiner *et al.*, 2007).

4.11 DETERMINAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS NO LBA

A contagem total de células foi realizada através da ressuspensão do pellet obtido do LBA em 1mL de PBS adicionado de EDTA, seguido da sua diluição em solução de TURK com a proporção de 1:10 (10µl para 90µl de TURK), em seguida foi realizada a contagem de células totais na câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico sob a objetiva de 40x (Alves-Filho *et al.*, 2008).

4.11.1 Avaliação diferencial de leucócitos do LBA

A determinação diferencial dos leucócitos totais no LBA, foi realizado através da citocentrifugação (cytospin) na proporção de 2×10^4 células em 40 μ l (450rpm por 5 minutos), após a obtenção do fixado de células e secagem foi realizada a coloração pelo método de H&E e em seguida a contagem diferencial no microscópio óptico sob a objetiva de 40x, onde foram contado a quantidade de células por campo, em uma quantidade de 4 campos, e posteriormente feito uma média com os campos (Sônego *et al.*, 2016).

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE NF κ B e IL-1 β POR WESTERN BLOT

Para a análise das proteínas NF κ B e IL-1 β foi realizada a técnica de Western Blot, na qual os tecidos pulmonares extraídos dos animais, homogeneizados em tampão de extração e centrifugado. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação da concentração de proteínas por fragmento de tecido extraído e outra para aplicação de SDS PAGE. O sobrenadante das amostras obtidas foi aliquotado com tampão de Laemmli e submetido à eletroforese gel de poliacrilamida para a separação de proteínas (SDS-PAGE). Posteriormente encaminhadas ao processo de leitura no fotodocumentador, em seguida foi quantificado a expressão da proteína alvo utilizando-se, para isso, o software Image Lab, sendo os resultados expressos em mg/proteína (Fido *et al.*, 1995).

4.13 ANÁLISE DA FUNÇÃO PULMONAR (ESPIROMETRIA)

Os animais foram anestesiados (Cetamina 100 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) por via i.p., traqueostomizados e por meio de um cateter interligado a um espirômetro para pequenos animais (AD Instruments®, Sidney, Austrália), primeiramente foi realizado uma calibração instilando 20mL de ar no equipamento seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente foi realizada a avaliação dos parâmetros de Fluxo Respiratório e Frequência Respiratória (FR) durante dez minutos. Os dados obtidos foram analisados através do software LabChart® (Guenther *et al.*, 2010).

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal). Para avaliação entre dois grupos foi utilizado o Test T de Student não pareado. As demais análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós teste de Bonferroni para os testes paramétricos e Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunns para os dados não paramétricos, sendo considerados resultados significativos com $p < 0,05^*$. As análises estatísticas dos dados e os gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc).

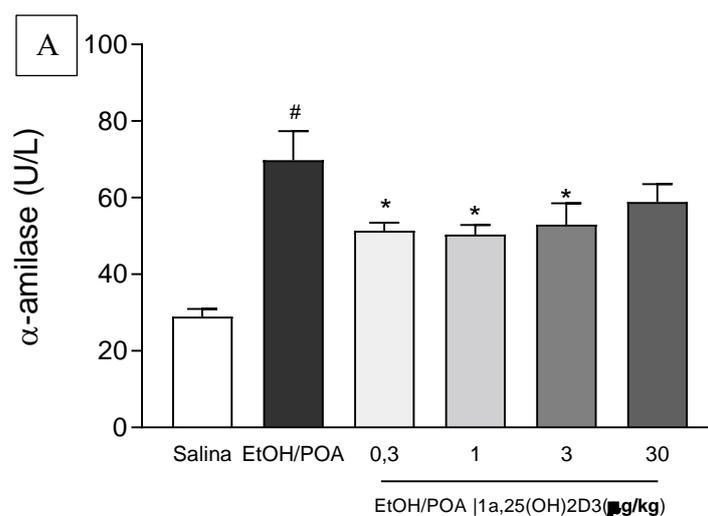
5 RESULTADO

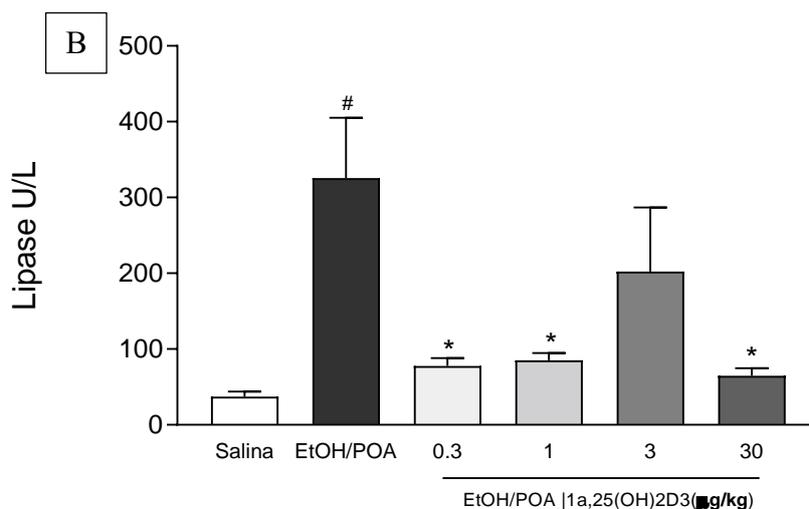
5.1 VITAMINA D3 REDUZ NÍVEIS SÉRICOS DE α -AMILASE E LIPASE OCACIONADO PELA PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA.

A mensuração dos níveis séricos de α -amilase, ocorreu um aumento ($p < 0,05$) no grupo EtOH/POA ($69,78 \pm 7,559$ U/L) em relação ao grupo Salina ($28,98 \pm 1,953$ U/L) e reduções significativas ($p < 0,05$) nos animais tratados com a vitamina D3 nas doses de $0,3 \mu\text{g/kg}$ ($51,38 \pm 2,069$ U/L), $1 \mu\text{g/kg}$ ($50,36 \pm 2,481$ U/L) e $3 \mu\text{g/kg}$ ($52,97 \pm 5,592$ U/L) quando comparado com o grupo EtOH/POA ($p < 0,05$). Contudo, a dose de $30 \mu\text{g/kg}$ ($58,85 \pm 4,654$ U/L) não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo EtOH/POA ($p > 0,05$) (Gráfico 1A).

Em relação aos níveis séricos de lipase, também foi possível observar um aumento no grupo EtOH/POA ($325,8 \pm 79,39$ U/L) em relação ao grupo Salina ($37,32 \pm 6,780$ U/L) ($p < 0,05$) e reduções significativas ($p < 0,05$) dessa enzima nos animais tratados com a vitamina D3 nas doses de $0,3$ ($77,74 \pm 10,23$ U/L), 1 ($85,16 \pm 9,608$ U/L), 3 ($202,3 \pm 84,37$ U/L) e 30 ($64,78 \pm 9,850$ U/L) quando comparado com o grupo EtOH/POA ($p < 0,05$) (Gráfico 1B).

Gráfico 1. Vitamina D3 reduz níveis séricos de α -amilase e lipase de camundongos submetidos a PA alcoólica.





Níveis séricos de α -amilase (A) e lipase (B) mensuradas nos animais do grupo Salina, EtOH/POA e tratados com vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. # $P < 0,05$ vs. Salina; * $P < 0,05$ vs. Grupo EtOH/POA, ao realizar o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente One-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni).

5.2 HISTOLOGIA DO PÂNCREAS E PULMÃO EM ANIMAIS INDUZIDOS COM PA E TRATADOS COM VITAMINA D3

As análises histológicas do pâncreas evidenciaram alterações significativas ($p < 0,05$), como edema, infiltrado de polimorfos nucleares e necrose com score total 7 (4-9) no grupo EtOH/POA quando comparado ao grupo ao score total 0 (0-0) do grupo Salina. Essas mesmas alterações não evidenciaram diferença estatística ($p > 0,05$) nos animais tratados com vitamina D3 nas doses de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total 3 (0-3), 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total 2,5 (1-3), 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total de 2 (0-3) e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total 7 (0-9), quando comparadas ao grupo EtOH/POA (Tabela 1).

A microscopia do tecido pulmonar, destacou alterações significativas ($p < 0,05$) no grupo EtOH/POA com presença de edema, infiltrado de polimorfos nucleares e espessamento alveolar com score total 5 (2-9), quando comparado ao grupo Salina com escore total score total 2,5 (1-5). Já o tratamento com a Vitamina D3 evidenciou uma melhora nas mesmas alterações histológicas analisadas, com exceção do edema, nas doses de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total 2 (1-3), 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total 2 (1-3) e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com escore total 0 (0-3), quando comparadas ao grupo EtOH/POA. A dose 0,3 não foi capaz de reduzir nenhum parâmetro analisado com escore total de 3 (1-7), quando comparada ao grupo EtOH/POA (Tabela 2).

Figura 4. Análise histológica da lesão pancreática em animais com PA alcoólica experimental. Método H&E, aumento 400x, do tecido pancreático de animais no tempo de 24 h após a indução da PA. (S)Salina; (P) EtOH/POA; (0,3) 0,3µg/Kg; (1) 1µg/Kg; (3) 3µg/Kg; (30) 30µg/Kg de vitamina D3.

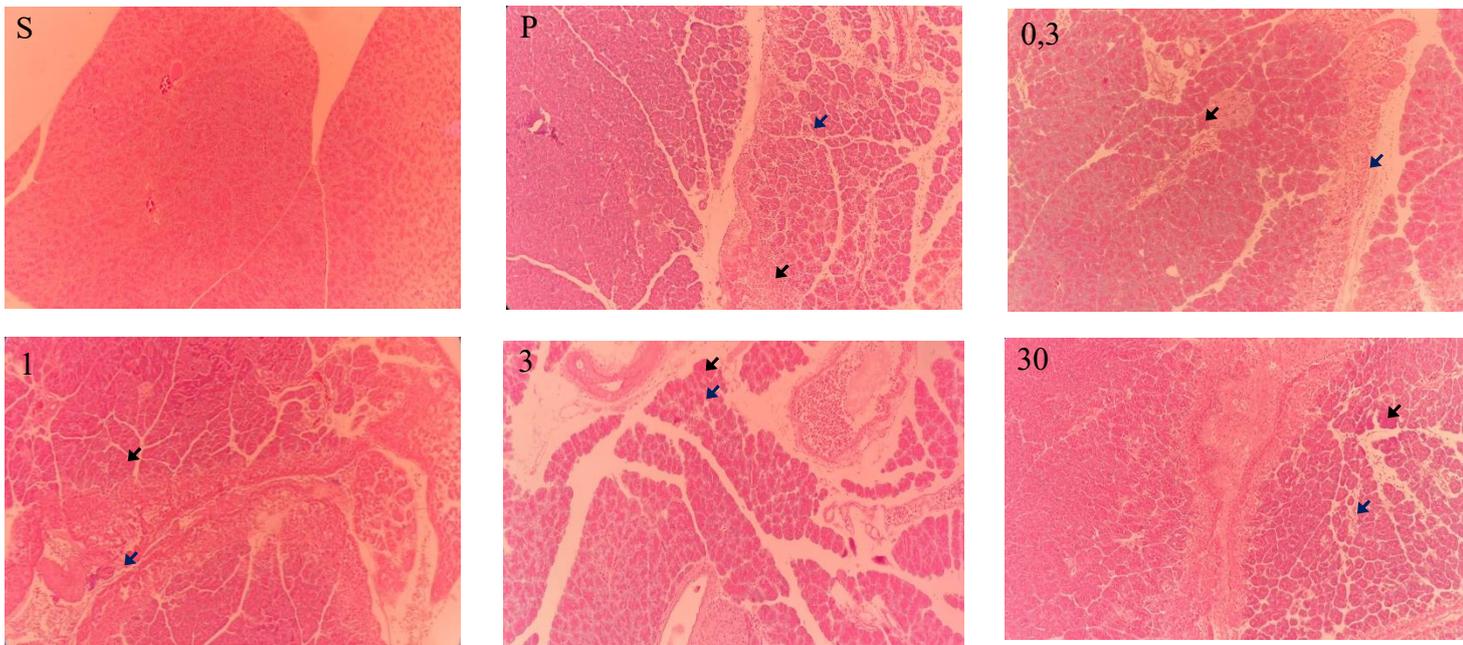


Tabela 1. Scores histológicos do pâncreas de animais com PA e tratados com vitamina D3.

Tabela 1.

Grupos	Edema	Infiltrado de PMN	Necrose	Scores Totais
Salina	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
EtOH/POA	3 (2-3) #	2 (1-3) #	2,5 (1-3) #	7 (4-9) #
0,3	3 (2-3)	2 (2-3)	3 (1-3)	8 (5-9)
1	3 (2-2)	2 (1-3)	2 (1-3)	7 (4-9)
3	2 (1-3)	1 (1-3)	1 (1-3)	4 (3-9)
30	3 (0-3)	2,5 (1-3)	2 (0-3)	7 (0-9)

Figura 5. Análise histológica da lesão pulmonar em animais com PA alcoólica experimental. Método H&E, aumento 400x, do tecido pancreático de animais no tempo de 24 h após a indução da PA. (S)Salina; (P) EtOH/POA; (0,3) 0,3µg/Kg; (1) 1µg/Kg; (3) 3µg/Kg; (30) 30µg/Kg de vitamina D3.

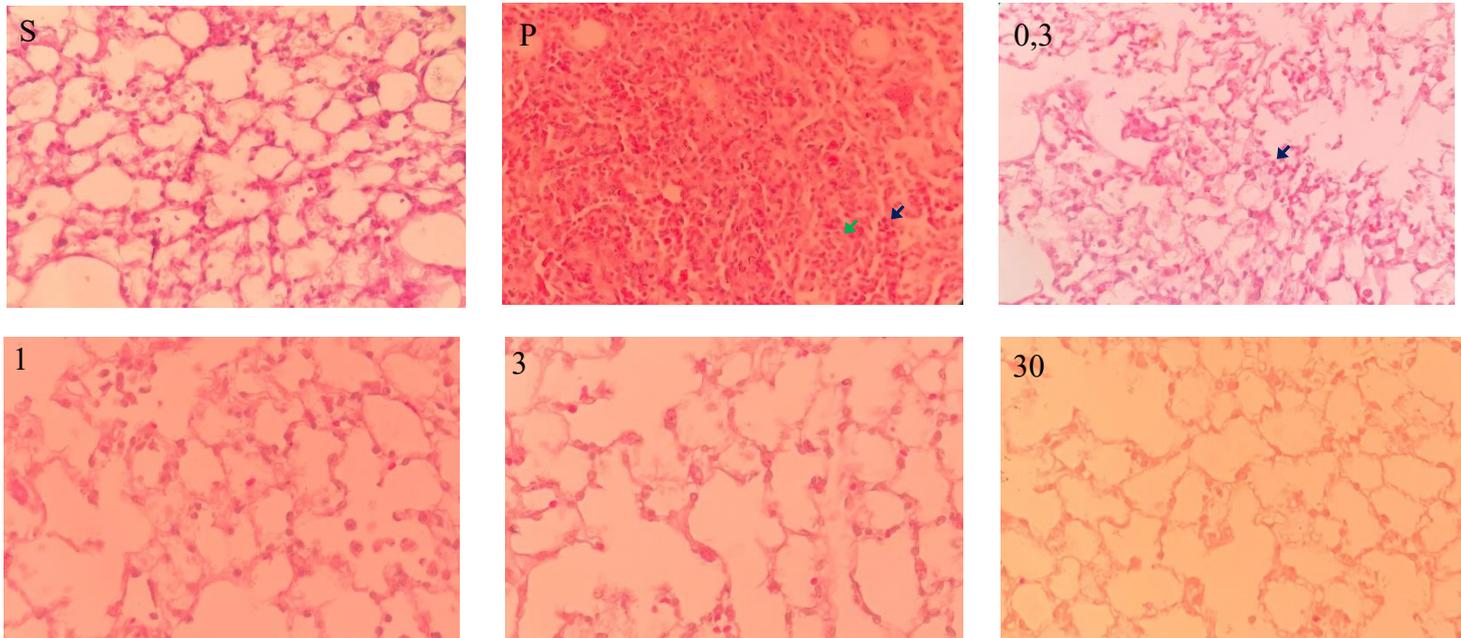


Tabela 2. Scores histológicos do pulmão de animais com PA e tratados com vitamina D3.

Tabela 2.

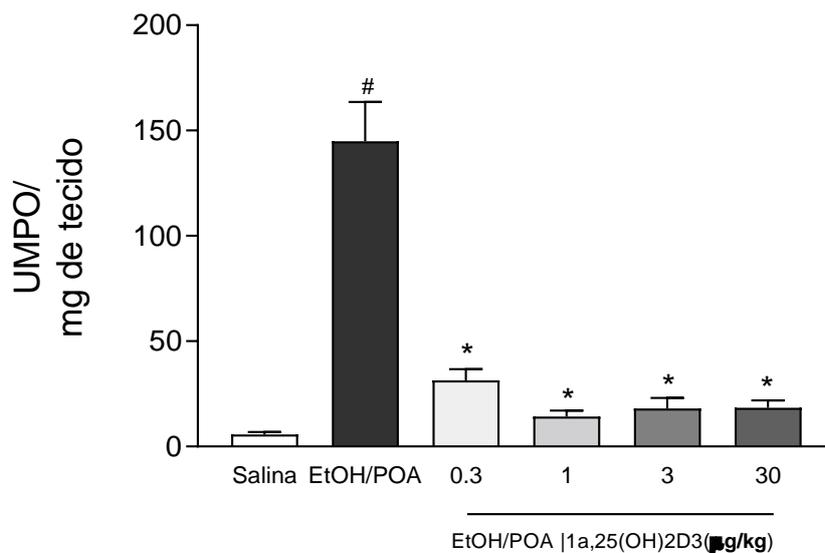
Grupos	Edema	Infiltrado de PMN	Espessamento Alveolar	Escores Totais
Salina	1 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-2)	2,5 (1-5)
EtOH/POA	1 (1-3) #	2 (1-3) #	2 (0-3) #	5 (2-9) #
0,3	1 (0-2)	1 (1-2)	1 (0-3)	3 (1-7)
1	1 (0-1)	1 (1-2) *	0 (0-0) *	2 (1-3) *
3	1 (0-1)	1 (1-2) *	1 (0-1) *	3 (1-4) *
30	0 (0-2)	0 (0-1) *	0 (0-0) *	0 (0-3) *

Escores histológico do pâncreas e do pulmão foram medidos nos grupos Salina, EtOH/POA e no tratamento com de vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 µg/Kg. Os resultados são expressos como a mediana com o valor máximo e mínimo, n = 6 por grupo. # p < 0,05 vs. Salina; * p < 0,05 vs. Grupo EtOH/POA. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn s). Seta azul polifomonucleado, seta preta necrose e seta verde espessamento alveolar.

5.3 TRATAMENTO COM VITAMINA D3 ATENUA ATIVIDADE DA MPO NO TECIDO PULMONAR.

A mensuração da enzima MPO no pulmão dos animais, indicou um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo EtOH/POA ($144,9 \pm 18,68$ UMPO) quando comparado ao grupo salina ($5,782 \pm 1,100$ UMPO). Já em relação ao tratamento com a vitamina D3, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) da MPO nas doses de $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($31,42 \pm 5,291$ UMPO), $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($14,27 \pm 2,899$ UMPO), $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($18,13 \pm 4,889$ UMPO) e $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($18,42 \pm 3,447$ UMPO) quando comparado com o grupo EtOH/POA (Gráfico 2).

Gráfico 2. Vitamina D3 limita a atividade da Mieloperoxidase no pulmão de animais submetidos a pancreatite alcoólica.

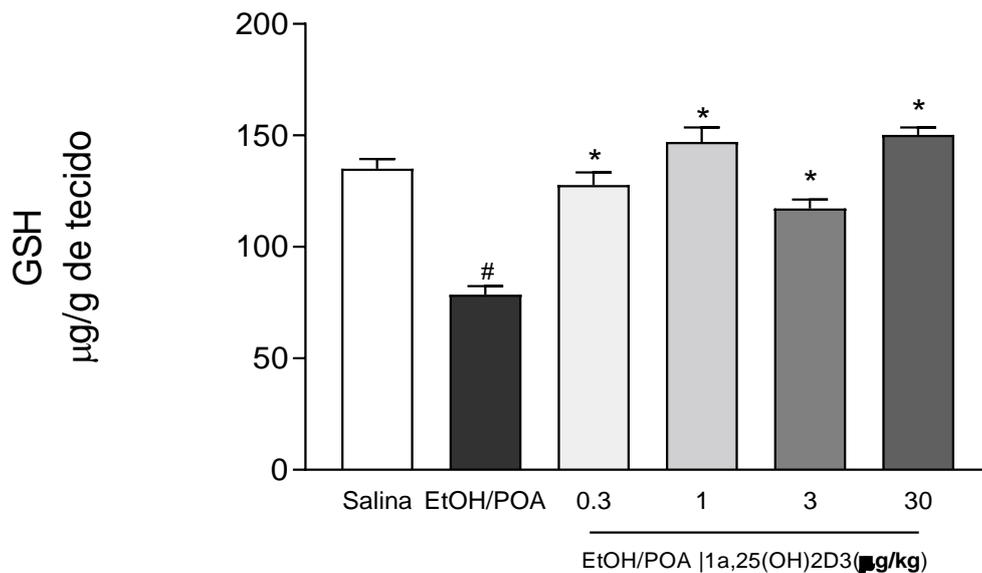


A atividade da mieloperoxidase no pulmão foram medidas no grupo Salina, EtOH/POA e no tratamento com de vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. # $P < 0,05$ vs. Salina; * $P < 0,05$ vs. grupo EtOH/POA. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente One-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni).

5.4 AVALIAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM ANIMAIS INDUZIDOS COM PANCREATITE AGUDA E TRATADOS COM A VITAMINA D3

Os níveis da glutathiona reduzida (GSH) foi avaliada no pulmão dos animais, onde se observou uma diminuição no grupo EtOH/POA ($78,52 \pm 3,946 \mu\text{g/g}$) quando comparado com o grupo Salina ($135,1 \pm 4,253 \mu\text{g/g}$) ($p < 0,05$). Já os tratamentos com a vitamina D3 nas doses de $0,3 \mu\text{g/kg}$ ($127,7 \pm 5,831 \mu\text{g/g}$) e $1 \mu\text{g/kg}$ ($147,0 \pm 6,549 \mu\text{g/g}$), $3 \mu\text{g/kg}$ ($117,3 \pm 3,967 \mu\text{g/g}$) e $30 \mu\text{g/kg}$ ($150,3 \pm 3,266 \mu\text{g/g}$) apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo EtOH/POA (Gráfico 3).

Gráfico 3. Avaliação Da Glutathiona Reduzida Em Animais Induzidos Com Pancreatite Aguda E Tratados Com A Vitamina D3.



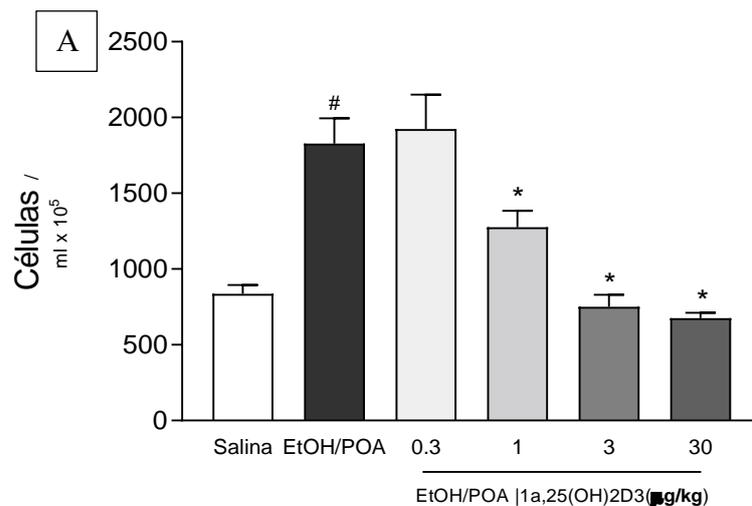
A avaliação do GSH foi medida no grupo Salina, EtOH/POA e no tratamento com de vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 µg/Kg. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. # $P < 0,05$ vs. Salina; * $P < 0,05$ vs. Grupo EtOH/POA. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente One-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni).

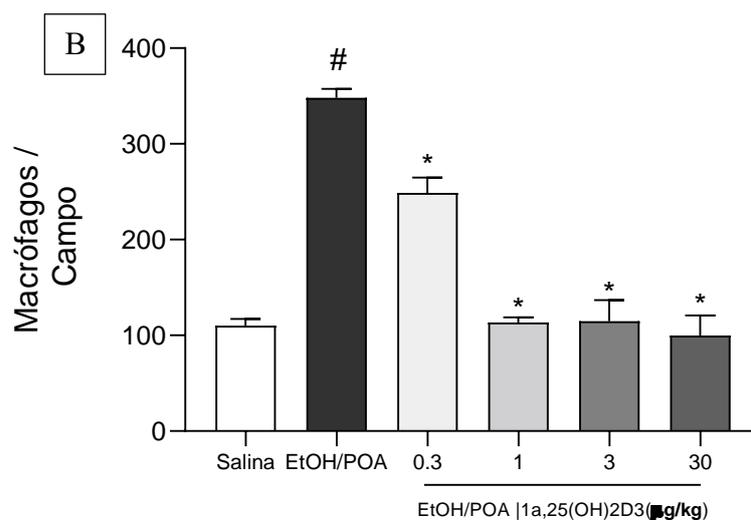
5.5 VITAMINA D3 DIMINUIU OS LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS NO LAVADO BRONCO ALVEOLAR DE CAMUNDONGOS COM PA

O número de leucócito presentes no LBA de camundongos com PA se apresentaram elevados no grupo EtOH/POA ($1828 \pm 166,8$) quando comparado com o grupo Salina ($837,5 \pm 56,43$) ($p < 0,05$). Em relação ao tratamento com vitamina D3 observou uma redução no número de leucócitos nas doses de 1 ($1275 \pm 109,4$), 3 ($750 \pm 81,01$) e 30 ($675 \pm 36,8$) quando comparado com o grupo EtOH/POA ($p < 0,05$), contudo a dose de 0,3 ($1925 \pm 225,9$) não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) (Gráfico 4A).

O número de macrófagos no LBA se apresentou elevados no grupo EtOH/POA ($348,2 \pm 9,313$) quando comparado com o grupo Salina ($110 \pm 7,211$) ($p < 0,05$). Já em relação ao tratamento com a vitamina D3 observou uma redução no número de leucócitos nas doses de 0,3 ($248,7 \pm 16,18$), 1 ($113,3 \pm 5,608$), 3 ($114,7 \pm 22,30$) e 30 ($99,67 \pm 21,18$) quando comparado com o grupo EtOH/POA ($p < 0,05$) (Gráfico 4B)

Gráfico 4. Vitamina D3 diminuiu o número de leucócitos e macrófagos no lavado bronco alveolar de camundongos com PA.





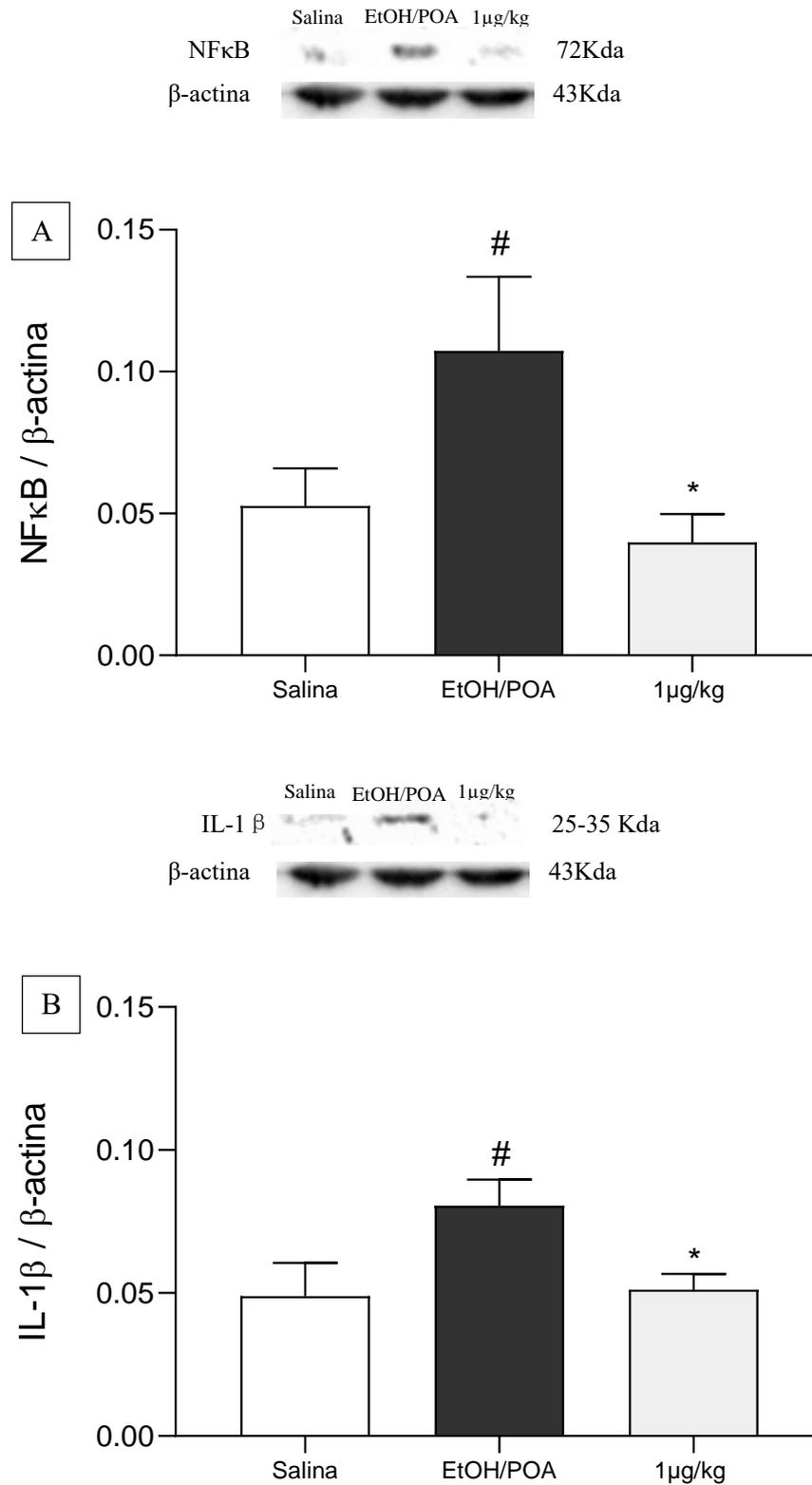
O número de leucócitos e macrófagos no LBA foram medidos no grupo Salina, EtOH/POA e no tratamento com de vitamina D3 nas doses de 0,3, 1, 3 e 30 µg/Kg. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. # $P < 0,05$ vs. Salina; * $P < 0,05$ vs. Grupo EtOH/POA. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente One-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni).

5.6 VITAMINA D3 DIMIUIU OS NÍVEIS DE NF κ B E IL-1 β NO PULMÃO

A dosagem de NF κ B e IL-1 β foram avaliados por western blot, onde foi observado um aumento na quantidade de NF κ B no grupo EtOH/POA ($0,1073 \pm 0,02608$) em comparação com o grupo salina ($0,05266 \pm 0,01327$), o grupo com o tratamento com vitamina d3 na dose de $1 \mu\text{g/kg}$ ($0,03980 \pm 0,01003$) apresentou uma diminuição significativamente estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo EtOH/POA (Gráfico 5A).

Em relação a IL-1 β , os dados mostram um aumento na quantidade de proteínas no grupo EtOH/POA ($0,08052 \pm 0,009141$) em comparação com o grupo salina ($0,04892 \pm 0,01164$), o grupo com o tratamento com vitamina d3 na dose de $1 \mu\text{g/kg}$ ($0,05114 \pm 0,005522$) apresentou uma diminuição significativamente estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo EtOH/POA (Gráfico 5B).

Gráfico 5. Diminui os níveis de NFκB E IL-1β.



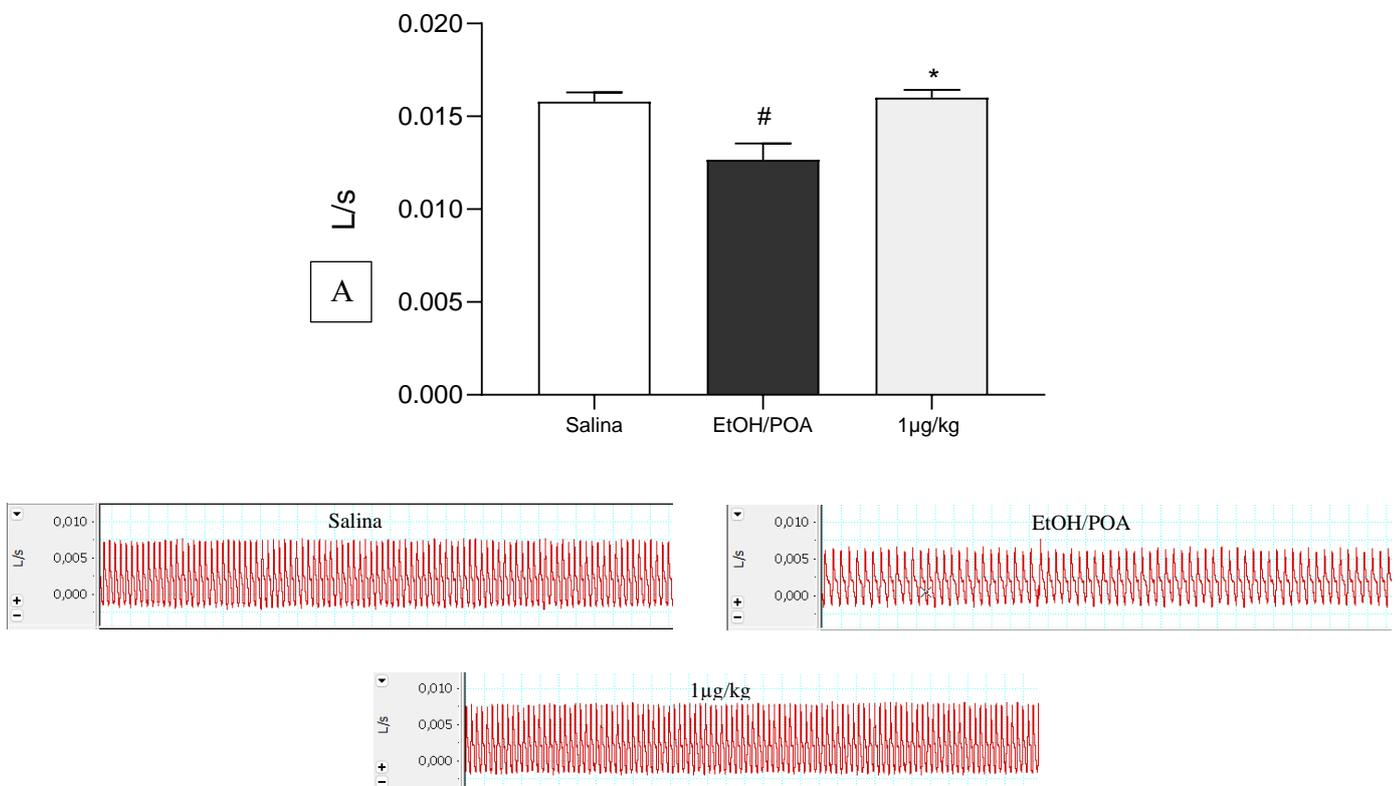
A NFκB (A) e a IL-1β (B) foram medidos no grupo Salina, EtOH/POA e no tratamento com de vitamina D3 na dose de 1μg/Kg. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média, n = 6 por grupo. # P < 0,05 vs. Salina; * P < 0,05 vs. Grupo EtOH/POA. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente One-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni).

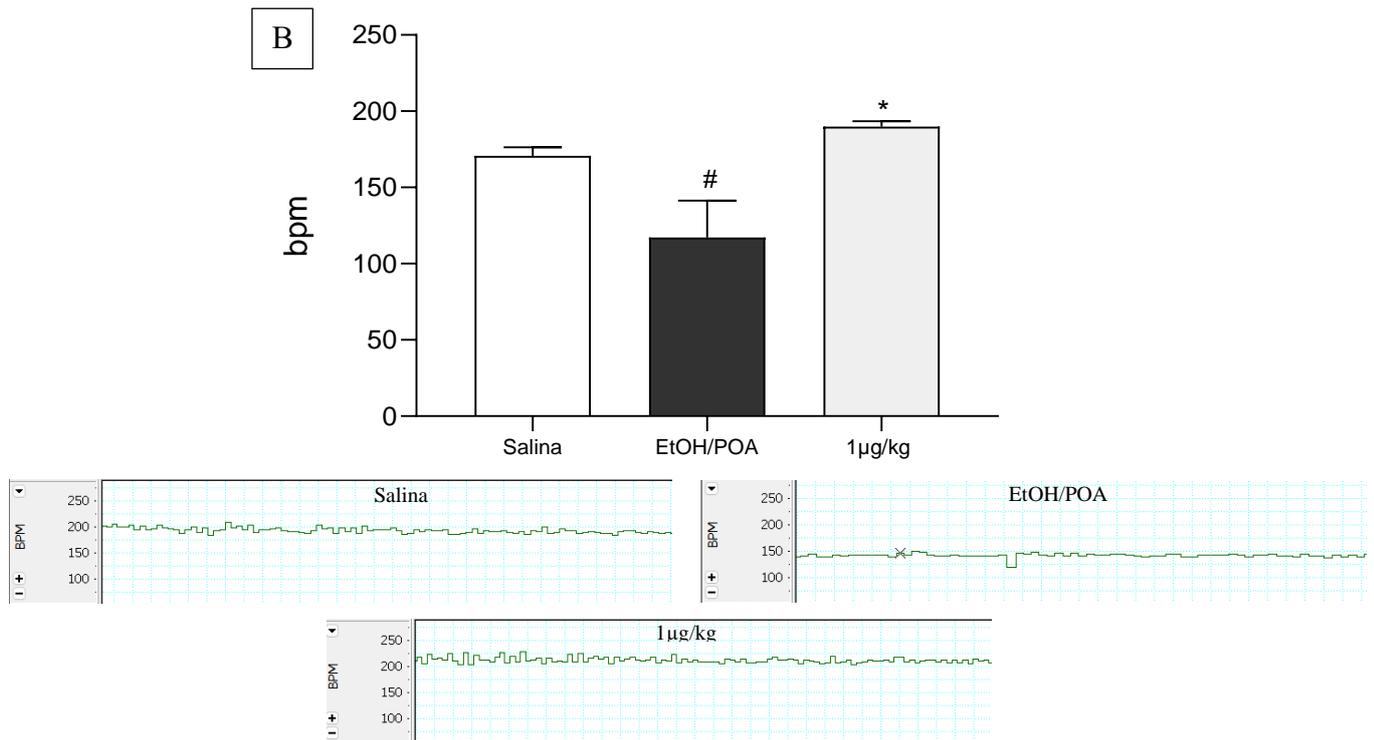
5.7 VITAMINA D3 PROTEGE ASPECTOS FUNCIONAIS DO PULMONAR

Os parâmetros funcionais do pulmão foram avaliados por meio de espirometria, através do fluxo respiratório e a frequência respiratória, onde foi observado uma diminuição no fluxo respiratório do grupo EtOH/POA ($0,01265 \pm 0,0008968$ L/s) quando comparado com o grupo Salina ($0,01578 \pm 0,0004991$ L/s) ($p < 0,05$). Já o grupo os animais tratados com a vitamina D3 na dose de $1\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentaram um aumento significativamente estatística ($p < 0,05$) no fluxo respiratório ($0,016 \pm 0,0004324$ L/s) quando comparado com o grupo EtOH/POA (Gráfico 6A).

Foi observado uma diminuição na frequência respiratória dos animais do grupo EtOH/POA ($117,2 \pm 24,09$ bpm) quando comparado com o grupo Salina ($170,8 \pm 5,454$ bpm) ($p < 0,05$). Já os animais tratados com a vitamina D3 na dose de $1\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentaram um aumento significativamente estatística ($p < 0,05$) na frequência respiratória ($189,8 \pm 3,698$ bpm) quando comparado com o grupo EtOH/POA (Gráfico 6B).

Gráfico 6. Vitamina D3 protege aspectos funcionais do pulmão.





A fluxo respiratório (A) e a frequência respiratória (B) foram medidos no grupo Salina, EtOH/POA e no tratamento com de vitamina D3 na dose de 1µg/Kg. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média, $n = 6$ por grupo. # $P < 0,05$ vs. Salina; * $P < 0,05$ vs. Grupo EtOH/POA. (Foi usado o teste de Shapiro-Wilk, posteriormente One-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

A lesão pulmonar reportada clinicamente em indivíduos com PA grave, apresenta características de dano alveolar difuso com espessamento dos alvéolos, infiltrado de células inflamatórias, com presença de citocinas inflamatórias, diminuição da função pulmonar com quebra da barreira alveolar, onde o alvéolo fica preenchido com líquido surfactante (Zhou *et al.*, 2010). Diante disso, no presente estudo, com o modelo de pancreatite aguda alcoólica experimental, foi demonstrado a capacidade da vitamina D3 em reverter os aspectos inflamatórios e oxidante, como MPO, GSH, alveolite, NF κ B e IL-1 β , no pulmão, além de diminuir o número de leucócitos e macrófagos presentes no LBA, e por fim, a vitamina D3 foi capaz de aumentar a função pulmonar, no fluxo respiratório e na frequências respiratória. Além disso a vitamina foi capaz de diminuir os níveis séricos de α -amilase e lipase, contudo, a vitamina D3 não se mostrou capaz de diminuir o dano histopatológico no pâncreas.

Semelhantes aos dados encontrados nesse estudo utilizando o modelo de pancreatite aguda alcoólica desenvolvida por HUANG e colaboradores, que administraram o metabolito da via não oxidativa do álcool em camundongos e observarem a presença de alterações características de PA como amilase, lipase e tripsina elevadas, necrose e infiltrado de células polimorfos nucleares no tecido pancreático, aumento na atividade da enzima MPO, presença de citocinas pró inflamatórias e também alterações pulmonares histológicas posteriormente investigadas em estudos experimentais utilizando o mesmo modelo, evidenciando infiltrado de polimorfonucleares, edema, espessamento alveolar, aumento das citocinas TNF- α e IL-1 β , aumento da atividade de MPO no tecido pulmonar, aumento no número de leucócitos totais e proteínas totais no lavado broncoalveolar (LBA) semelhantes a encontradas no grupo EtOH/POA desse estudo e de estudos anteriores do grupo de pesquisa, indicando assim, que o modelo de LPA advinda da PA (Carvalho, 2018; Huang *et al.*, 2014; Rocha, 2017).

De forma peculiar, o tratamento com a vitamina D3 foi capaz de diminuir os níveis sérico de α -amilase e lipase no modelo experimental de PA alcoólica, mas não de previr os danos histológicos no pâncreas dos animais. Os estudos indicam, que a liberação e ativação dessas enzimas ocorre principalmente devido a fusão vesicular e lisossomal nas células acinares do pâncreas e a consequente autofagia do tecido pancreático, conduzindo a evasão aumentada de amilase e lipase para a circulação sanguínea (Lankisch; Apte; Banks, 2015). A desregulação do cálcio tem sido destacada com um fator importante na inflamação pancreática, por resultar na despolarização das membranas vesiculares e liberação precoce das enzimas, além de uma disfunção mitocondrial importante (Bollen, 2016; Criddle, 2015; Garber *et al.*, 2018). Desse

ponto de vista, a vitamina D3 desempenha um papel importante na regulação, reabsorção e homeostase do cálcio (Sassi; Tamone; D'amelio, 2018) sendo esse um dos possíveis mecanismo envolvido na redução dos níveis séricos de α -amilase e lipase destacado por esse estudo em todas as doses testadas, exceto a de 30 μ g/kg para α -amilase. Outra justificativa do efeito limitado da vitamina D3 no pâncreas, possa estar associado a baixa expressão dos receptores de vitamina D (VDR) no tecido pancreático, principalmente nas células acinares que constitui a maior parte do órgão (Cai *et al.*, 2022). Outro ponto que pode ser relatado diante desse dado, é sobre a função do fator nuclear κ B, estudos experimentais conseguiram demonstrar a função do NF κ B sobre a patogenicidade a PA, onde animais knockou (KO) para um gene precursor do NF κ B foi capaz de diminuir os níveis séricos de α -amilase e lipase, contudo apenas houve uma redução no edema e infiltrado de células polimorfonucleadas, podendo indicar que o bloqueio do NF κ B não consegue prevenir totalmente o dano histopatológico no tecido pancreático (Altavilla *et al.*, 2003; Jakkampudi *et al.*, 2016).

A LPA resulta em dano alveolar difuso com processo inflamatório evidente e hipoxemia grave, direcionando a intervenções médica direta e imediata como a ventilação mecânica e administração de glicocorticoides e vasodilatadores inalatórios conduzindo a um tratamento limitado e momentâneo não específico ao paciente (Iyer *et al.*, 2020; Matthay; Ware; Zimmerman, 2012; Lewis *et al.*, 2019; Nanchal; Truwit, 2018). Os aspectos de alveolite causada pela PA, é citada pela literatura por estar associada ao desenvolvimento SRIS e principalmente a mediadores inflamatórios circulantes, advindos dessa síndrome, atingindo órgãos como o pulmão, onde Cecilia e colaboradores demonstraram a presença desse processo inflamatório no pulmão de animais induzidos no modelo de pancreatite alcoólica experimental, apresentando alterações como edema, infiltrado de polimorfos nucleares e espessamento alveolar como evidenciado no grupo EtOH/POA descrito por esse estudo e outros trabalhos demonstrando assim a ligação da PA com a SRIS, e por consequência ocorre o desenvolvimento da LPA (Ge *et al.*, 2020; Vrolyk; Singh, 2020; Zhou *et al.*, 2010). A redução do dano tecidual pulmonar foi evidente nos animais submetidos a PA alcoólica experimental e tratados com a vitamina D3 em todas as doses analisadas, exceto na de 0.3 μ g/kg e para o parâmetro edema nas demais doses, onde outro estudo experimental conseguiu demonstrar a eficácia da vitamina D3 sobre a lesão pulmonar induzida por bleomicina (Tan *et al.*, 2016).

A mensuração da atividade da MPO é utilizada em diversos trabalhos experimentais, a fim de complementar os achados de infiltração e ativação de neutrófilos e direcionar a um processo inflamatório (Lin *et al.*, 2024), como no estudo Manchada e colaboradores que demonstram o papel da mieloperoxidase sobre o processo inflamatório sobre o tecido endotelial

(Manchanda *et al.*, 2018). A elevação dos níveis da MPO no tecido pulmonar dos animais do grupo EtOH/POA encontradas nesse estudo, são concordantes com os achados na literatura ao avaliar pulmões de animais com PA alcoólica utilizando o modelo de PA utilizando o POA, onde foi visto um aumento da atividade de MPO no pulmão de animais induzidos com PA alcoólica (Carvalho, 2018). Outro estudo experimental de Elder e colaboradores, utilizando ceruleína como indutor da PA, demonstraram um aumento na atividade da enzima MPO no tecido pulmonar em ratos, e um aumento significativo com a presença de lipopolissacarídeos (LPS) em conjunto com a PA (Elder *et al.*, 2012).

O tratamento com a vitamina D3 em todas as doses administradas foram eficazes na redução dos níveis da MPO no pulmão dos animais induzidos com PA alcoólica, e essa ação pode estar associada a presença do VDR na maioria das células do sistema imunológico, como os macrófagos e os neutrófilos, agindo de forma modulatória sobre as células do sistema imune, nos macrófagos a vitamina D3 conseguiu ter efeito sobre a ativação de seus subtipos pró e anti-inflamatórios (Di Rosa *et al.*, 2012; Reichelt *et al.*, 1987; Small *et al.*, 2021).

Estudos demonstram que a vitamina D se mostrou bastante eficaz agindo contra o estresse oxidativo em doses durante o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (Cojic *et al.*, 2021; Hassan Eftekhari *et al.*, 2014). Outros estudos mostram que o uso da vitamina D teve efeito sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH), onde com o tratamento houve um aumento nos níveis de GSH, onde foi possível observar uma elevação do que no grupo controle (Cojic *et al.*, 2021; Sepidarkish *et al.*, 2019). Diante disso, no presente estudo foi possível observa que o GSH no pulmão com o tratamento da vitamina D3 foi possível reverter os nível de GSH, se igualando ao grupo controle, indo de encontro a dados na literatura que demonstram esse efeito contra o estresse oxidativo da vitamina D, onde um estudo mostrou que a presença de estresse oxidativo na artrite reumatoide (RA), o níveis de vitamina D disponíveis são diminuídos em pacientes, e quando a sua suplementação, os níveis de GSH são aumentados e de espécies reativas de oxigênio (ROS) são reduzidos (Mateen *et al.*, 2017).

A análise de acúmulo de leucócitos e a identificação do tipo celular no LBA, representa uma das principais análises do quadro inflamatório de doenças respiratórias como a SDRA, a lesão pulmonar e doenças agudas pulmonares, por conta de os macrófagos alveolares serem células residentes do tecido pulmonar, elas costumam ter uma ação inicial em doenças agudas e agindo sobre infecções por agentes externos (Hu; Christman, 2019; Hussell; Bell, 2014; Soni *et al.*, 2016).

A elevação de macrófagos no espaço broncoalveolar, foi destacado como o principal evento diretamente relacionado ao pico inflamatório em 24h da lesão pulmonar nos animais

submetidos a PA alcoólica utilizando o POA, com elevação e a possível mudanças no fenótipo dessas células, inferindo a presença de macrófagos do tipo M1 ou pró-inflamatórios. (Carvalho, 2018).

Durante o presente estudo, os o número de leucócitos presentes no LBA dos animais tratados com a vitamina D3 nas doses de 1, 3 e 30 μ g/Kg se apresentou diminuído em relação com o grupo induzido com PA, isso pode ser pelo fato em que a vitamina D3 apresenta função moduladora em diversos tipos de células, onde os macrófagos são particularmente bem suscetíveis a esse processo modulador, onde já foi mostrado antes que a vitamina D foi eficaz em diminuir o número de células no LBA de animais com injúria pulmonar (Kong *et al.*, 2013). Além disso, conseguimos observar uma redução significativa na quantidade de macrófagos presentes no LBA, em todas as doses de tratamento com a vitamina D3 quando comparado com o grupo PA, indicando que a redução total no número de células pode estar relacionada com a diminuição dos macrófagos nos espaços alveolares, corroborando com dados anteriores do nosso grupo de pesquisa que mostrou que durante o processo inflamatório da PA e o desenvolvimento da SDRA os MO^A são o principal tipo celular presente (Carvalho, 2018).

Durante o processo inflamatório da PA, ocorre um aumento de citocinas, Girão (2017) conseguiu demonstrar um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , no tecido pancreático no modelo de pancreatite aguda alcoólica experimental (Girão, 2017). Outro estudo experimental de Carvalho (2018), também conseguiu demonstrar um aumento de IL-1 β no tecido pulmonar no modelo de pancreatite aguda alcoólica experimental, demonstrando assim um aumento dessa citocina no pulmão de animais induzidos com PA, dado similar aos encontrados no presente estudo (Carvalho, 2018). Outras citocinas pró-inflamatórias se fazem presentes durante o processo inflamatório, como a NF κ B, que está presente durante o início do processo inflamatório da PA, conseguindo ser capaz de recrutar outros agentes inflamatórios, onde estudos experimentais conseguiram demonstrar a sua presença em animais induzidos com PA, similar aos achados no presente estudo. Além disso, animais knockout para um precursor da NF κ B apresentaram uma redução no MPO, GSH e TNF- α , demonstrando assim um papel importante sobre a patogenicidade a PA (Altavilla *et al.*, 2003; Jakkampudi *et al.*, 2016). Além disso, outros estudos sugerem que os macrófagos residentes são células capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, quando estão em seu perfil fenotípico M1, assim recrutando outros mediadores inflamatórios para o local da lesão, sugerindo assim, que grande parte das citocinas presentes no tecido pulmonar sejam recrutadas pelos próprios macrófagos alveolares (Vanherwegen; Gysemans; Mathieu, 2017).

A vitamina D3 se provou capaz de reduzir citocinas inflamatórias, como a IL-1 β e NF κ B, um estudo experimental que utilizou a vitamina D como agente anti-inflamatório na lesão pulmonar conseguiu demonstrar que a vitamina D é capaz de reduzir os níveis dessas enzimas presentes durante a lesão, apresentando assim dados similares aos encontrados no presente estudo, enfatizando assim o papel da vitamina D sobre a LPA (Liu *et al.*, 2018; Yeh *et al.*, 2022). Outros estudos mostram que a vitamina D3 em sua forma ativa (1,25(OH)2D3), se mostrou capaz de atuar sobre os macrófagos residentes, se mostrando capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e NF κ B, atuando como um agente mediador inflamatório e diminuindo a lesão local causada pelos macrófagos residentes, fazendo uma correlação com os achados do presente estudo, onde além da diminuição do número de macrófagos alveolares, a vitamina D3 também foi capaz de diminuir a IL-1 β e NF κ B presentes no tecido pulmonar (Vanherwegen; Gysemans; Mathieu, 2017).

Estudos mostram que o acometimento pulmonar da SDRA gera uma lesão obstrutiva gerando assim um problema no fluxo respiratório, problema relatado bastante em doenças como no covid-19 (Borek *et al.*, 2023). Recentemente com a pandemia de covid-19 vários estudos voltados para essa área foram realizados, sendo a principal causa da mortalidade de pacientes com covid-19 era advinda de problemas na função pulmonar, tendo o pulmão como o principal órgão atingido, onde o fluxo respiratório e a frequência respiratória do objeto de estudos se mostraram bastante debilitados quando comparados com pacientes saudáveis (Batah; Fabro, 2021), onde vem sendo sugerido a vitamina D3 como um possível tratamento contra a lesão pulmonar causada por covid-19 (Malaguarnera, 2020). Além disso Carvalho (2018) também mostrou que animais induzidos com PA apresentaram suas funções respiratórias bem diminuídas quando comparados com o grupo controle (Carvalho, 2018). Diante desses fatos, o presente estudo foi possível replicar o modelo anterior de PA com lesão pulmonar, sendo o grupo induzido com a doença apresentou um comprometimento da função pulmonar, entretanto o tratamento com a vitamina D3 na dose de 1 μ g/kg foi capaz de melhorar as funções pulmonares desses animais. Essa melhora na função pulmonar causada pela vitamina D3 já foi demonstrada em outros estudos um potencial dessa vitamina de aumentar a capacidade respiratória por meio de uma bronco dilatação (Bossé; Maghni; Hudson, 2007). Outro estudo de Kong e colaboradores foi demonstrado que a vitamina D3 conseguiu melhorar a elasticidade pulmonar, e assim melhorando a respiração (Kong *et al.*, 2013). Além disso, Tan e colaboradores mostraram que a dose de 1 μ g/kg foi eficaz na reversão de diversos aspectos inflamatórios, como no edema, infiltrado e espessamento alveolar, levando também na diminuição de citocinas pró

inflamatórias como NF κ B, TNF- α , IL-1 β e IL-6 no modelo de lesão pulmonar induzida por bleomicina (Tan *et al.*, 2016).

Diante dos dados apresentados, o presente estudo apresenta limitações diante ao tipo de estudo, pois a patogenicidade da LPA e conseqüentemente da SDRA ainda não se encontram totalmente elucidadas, necessitando assim uma caracterização do perfil de células inflamatórias, em específicos os macrófagos alveolares, que se fazem presentes no desenvolvimento da doença, capazes de manter, aumentar e diminuir o processo inflamatório no ambiente alveolar. Contudo, a vitamina D3 demonstrou ter um potencial tratamento para o processo inflamatório da PA, e podendo atuar como um possível modulador de macrófagos alveolares, assim, como perspectivas futuras do presente estudo visariam investigar mais a fundo o perfil fenotípico de macrófagos alveolares, podendo assim determinar o tipo de célula presente no desenvolvimento da doença, e em seguida utilizar a vitamina D3 como um possível agente modulador de macrófago alveolar, *in vitro* e *in vivo*.

7 CONCLUSÃO

A administração de vitamina D3 foi capaz de:

- Reduzir os níveis séricos de α -amilase e principalmente lipase, de animais submetidos a PA alcoólica experimental;
- Limitar os danos histopatológicos do pulmão, com exceção do edema, de animais submetidos a PA alcoólica experimental;
- Restringir a atividade da enzima MPO no pulmão de animais submetidos a PA alcoólica experimental;
- Prevenir o consumo e elevar os níveis de GSH no tecido pulmonar de animais submetidos a PA alcoólica experimental;
- Reduzir o número de leucócitos totais e macrófagos no LBA de animais submetidos a PA alcoólica experimental;
- Diminuir a quantidade de citocinas pró-inflamatória, IL-1 β e NF κ B, no pulmão de animais submetidos a PA alcoólica experimental;
- E a capacidade de melhorar o fluxo respiratório e a frequência respiratória de animais submetidos a PA alcoólica experimental.

8 REFERÊNCIAS

ABDULLA, A. *et al.* Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 5, p. 975–982, 2 ago. 2011.

ADAMS, J. S. *et al.* **Metabolism of 25-Hydroxyvitamin D3 by Cultured Pulmonary Alveolar Macrophages in Sarcoidosis.** [s.l.: s.n.].

ALTAVILLA, D. *et al.* Attenuated Cerulein-Induced Pancreatitis in Nuclear Factor- κ B-Deficient Mice. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 12, p. 1723–1732, dez. 2003.

ALVES-FILHO, J. C. *et al.* **The role of neutrophils in severe sepsis.** Shock. **Anais...out.** 2008.

APTE, M. V.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 25, n. 12, p. 1816–1826, 2010.

ATKINSON, M. A. *et al.* **Organisation of the human pancreas in health and in diabetes.** **Diabetologia** Springer, , 1 out. 2020.

BATAH, S. S.; FABRO, A. T. **Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians.** **Respiratory Medicine** W.B. Saunders Ltd, , 1 jan. 2021.

BHARDWAJ, P. *et al.* A Randomized Controlled Trial of Antioxidant Supplementation for Pain Relief in Patients With Chronic Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, 2009.

BHARMAL, S. H. *et al.* Relationship between circulating levels of pancreatic proteolytic enzymes and pancreatic hormones. **Pancreatology**, v. 17, n. 6, p. 876–883, 1 nov. 2017.

BHATIA, R. *et al.* **Alcohol and smoking mediated modulations in adaptive immunity in pancreatitis.** **Cells** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2020.

BOLLEN, T. L. **Acute pancreatitis: International classification and nomenclature.** **Clinical Radiology** W.B. Saunders Ltd, , 1 fev. 2016.

BOREK, I. *et al.* **The vascular perspective on acute and chronic lung disease.** **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, , 15 ago. 2023.

BOSSÉ, Y.; MAGHNI, K.; HUDSON, T. J. $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D3 stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. **Physiological Genomics**, v. 29, n. 2, p. 161–168, 24 abr. 2007.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol** ., v. 78, 1982.

CABRERA-BENITEZ, N. E. *et al.* Mechanical Ventilation–associated Lung Fibrosis in Acute Respiratory Distress Syndrome. **Anesthesiology**, v. 121, n. 1, p. 189–198, 1 jul. 2014.

CAI, F. *et al.* **Vitamin D and Pancreatitis: A Narrative Review of Current Evidence.**

NutrientsMDPI, , 1 maio 2022.

CARVALHO, C. M. M. DE. **PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL GRAVE CURSA COM DISFUNÇÃO PULMONAR, ENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS E DANO DIAFRAGMÁTICO.** Fortaleza: [s.n.].

CASTRO, L. C. G. DE. **O sistema endocrinológico vitamina D The vitamin D endocrine system**Arq Bras Endocrinol Metab. [s.l: s.n.].

CHOOKLIN, S. Pathogenic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 8, p. 186–191, 15 abr. 2009.

COJIC, M. *et al.* The Effects of Vitamin D Supplementation on Metabolic and Oxidative Stress Markers in Patients With Type 2 Diabetes: A 6-Month Follow Up Randomized Controlled Study. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 19 ago. 2021.

CONFALONIERI, M.; SALTON, F.; FABIANO, F. **Acute respiratory distress syndrome.** **European Respiratory Review**European Respiratory Society, , 2017.

CRIDDLE, D. N. *et al.* The pancreas misled: Signals to pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, n. 5–6, p. 436–446, 2007.

CRIDDLE, D. N. **The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison.** **Pancreatology**Elsevier B.V., , 1 jul. 2015.

CRUCIANI, R. A. Salutations to the Pancreas! **Pancreatology**, v. 7, n. 5–6, p. 409–410, out. 2007.

DAMASCENO, S. R. B. **ConA e ConBr PREVINEM AUMENTO DE [Ca²⁺]c E NECROSE DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS E MELHORAM PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA EXPERIMENTAL.** [s.l: s.n.].

DEB, S.; SAKHARKAR, P. **Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism: Implications on Non-Bone Diseases.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/337811243>>.

DI ROSA, M. *et al.* Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 1, p. 36–43, nov. 2012.

DUSHIANTHAN, A. *et al.* **Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury.** **Postgraduate Medical Journal**, set. 2011.

ELDER, A. S. F. *et al.* **Evaluation of lung injury and respiratory mechanics in a rat model of acute pancreatitis complicated with endotoxin.** **Pancreatology.** Anais...Elsevier B.V., 2012.

FERNANDES, A. L. *et al.* **Effect of a Single High Dose of Vitamin D 3 on Cytokines, Chemokines and Growth Factor in Patients With Moderate to Severe COVID-19.** [s.l: s.n.].

FORNO, E. *et al.* Effect of Vitamin D3 Supplementation on Severe Asthma Exacerbations in Children with Asthma and Low Vitamin D Levels: The VDKA Randomized Clinical Trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 8, p. 752–760, 25 ago. 2020.

FUKUI, H. **Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? Inflammatory Intestinal Diseases**. Karger AG, , 1 out. 2016.

GARBER, A. *et al.* **Mechanisms and management of acute pancreatitis. Gastroenterology Research and Practice** Hindawi Limited, , 2018.

GE, P. *et al.* **Intestinal barrier damage, systemic inflammatory response syndrome, and acute lung injury: A troublesome trio for acute pancreatitis. Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson s.r.l., , 1 dez. 2020.

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

GIRÃO, D. K. F. B. **PARTICIPAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP 3 E DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS NA HIPERALGESIA VISCERAL DA PANCREATITE ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**. Fortaleza: [s.n.].

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. 4, p. 901–907, out. 2010.

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

HABTEZION, A.; GUKOVSKAYA, A. S.; PANDOL, S. J. Acute Pancreatitis: A Multifaceted Set of Organelle and Cellular Interactions. **Gastroenterology**, v. 156, n. 7, p. 1941–1950, 1 maio 2019.

HANSDOTTIR, S.; MONICK, M. M. **Vitamin D Effects on Lung Immunity and Respiratory Diseases**. [s.l: s.n.]. v. 86

HASSAN EFTEKHARI, M. *et al.* **The effect of calcitriol on lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus** ARYA Atheroscler. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.mui.ac.ir>.

HU, G.; CHRISTMAN, J. W. **Editorial: Alveolar macrophages in lung inflammation and resolution. Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 1 set. 2019.

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. 1313–1324, 2014.

HUSSELL, T.; BELL, T. J. **Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. Nature Reviews Immunology**, fev. 2014.

JAKKAMPUDI, A. *et al.* **NF- κ B in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential.** *Pancreatology* Elsevier B.V., , 1 jul. 2016.

JANCSÓ, Z.; SAHIN-TÓTH, M. Chronic progression of cerulein-induced acute pancreatitis in trypsinogen mutant mice. *Pancreatology*, v. 22, n. 2, p. 248–257, mar. 2022.

JUNG, Y. CHUL; NAMKOONG, K. Alcohol: Intoxication and poisoning - diagnosis and treatment. Em: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 125p. 115–121.

KONG, J. *et al.* VDR attenuates acute lung injury by blocking Ang-2-Tie-2 pathway and renin-angiotensin system. *Molecular Endocrinology*, v. 27, n. 12, p. 2116–2125, 1 dez. 2013.

LANKISCH, P. G.; APTE, M.; BANKS, P. A. **Acute pancreatitis.** The Lancet. *Anais...* Lancet Publishing Group, 4 jul. 2015.

LEITE, K. E. S. D. S. **INVESTIGAÇÃO DA NOCICEPÇÃO VISCERAL E TRANSTORNOS DE HUMOR ASSOCIADOS A PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA EXPERIMENTAL: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINÓIDE.** Fortaleza: [s.n.].

LERCH, M. M.; GORELICK, F. S. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, v. 144, n. 6, p. 1180–1193, 2013.

LEWIS, S. R. *et al.* Pharmacological agents for adults with acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2019, n. 7, 23 jul. 2019.

LIN, T. *et al.* Vitamin D and idiopathic pulmonary fibrosis: a two-sample mendelian randomization study. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

LIN, W. *et al.* **The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases: The New Progress.** *Antioxidants* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jan. 2024.

LIU, C.; XIAO, K.; XIE, L. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 9 ago. 2022.

LIU, W. *et al.* **The anti-inflammatory effects of vitamin D in tumorigenesis.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 13 set. 2018.

MA, D.; PENG, L. **Vitamin D and pulmonary fibrosis: a review of molecular mechanisms** *Int J Clin Exp Pathol*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ijcep.com/>.

MALAGUARNERA, L. **Vitamin d3 as potential treatment adjuncts for covid-19.** *Nutrients* MDPI AG, , 1 nov. 2020.

MANCHANDA, K. *et al.* MPO (Myeloperoxidase) Reduces Endothelial Glycocalyx Thickness Dependent on Its Cationic Charge. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 38, n. 8, p. 1859–1867, ago. 2018.

- MATEEN, S. *et al.* Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017.
- MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. **The acute respiratory distress syndrome. Journal of Clinical Investigation**, 1 ago. 2012.
- MAXEINER, J. H. *et al.* A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 105–112, fev. 2007.
- MAYERLE, J. *et al.* Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 156, n. 7, p. 1951- 1968.e1, 1 maio 2019.
- MUHS, B. E. *et al.* Inhibition of Matrix Metalloproteinases Reduces Local and Distant Organ Injury Following Experimental Acute Pancreatitis. 2003.
- NANCHAL, R. S.; TRUWIT, J. D. Recent advances in understanding and treating acute respiratory distress syndrome. **F1000Research**, v. 7, p. 1322, 20 ago. 2018.
- REICHEL, H. *et al.* **25-Hydroxyvitamin D 3 Metabolism by Lipopolysaccharide-Stimulated Normal Human Macrophages*** **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** Copyright©. [s.l: s.n.].
- ROBERTS, K. M. *et al.* **Nutritional Aspects of Acute Pancreatitis. Gastroenterology Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 mar. 2018.
- ROCHA, L. K. Estudo do papel do receptor de quimiocina CCR2 no modelo experimental de lesão pulmonar associada à pancreatite aguda induzida pela administração de etanol e ácido palmítico. 2017.
- SANTOS, J. S. DOS *et al.* **PANCREATITE AGUDA: ATUALIZAÇÃO DE CONCEITOS E CONDUTAS ACUTE PANCREATITIS: REVIEW OF CONCEPTS AND MANAGEMENT.** [s.l: s.n.].
- SASSI, F.; TAMONE, C.; D'AMELIO, P. **Vitamin D: Nutrient, hormone, and immunomodulator. Nutrients** MDPI AG, , 3 nov. 2018.
- SEPIDARKISH, M. *et al.* **The effect of vitamin D supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Pharmacological Research** Academic Press, , 1 jan. 2019.
- SHAH, J.; RANA, S. S. **Acute respiratory distress syndrome in acute pancreatitis. Indian Journal of Gastroenterology** Springer, , 1 abr. 2020.
- SHIH, H. P.; WANG, A.; SANDER, M. **Pancreas organogenesis: From lineage determination to morphogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology**, out. 2013.
- ŚLIWIŃSKA-MOSSOŃ, M.; MAREK, G.; MILNEROWICZ, H. **The role of pancreatic**

polypeptide in pancreatic diseases. Advances in Clinical and Experimental MedicineWroclaw University of Medicine, , 1 dez. 2017.

SMALL, A. G. *et al.* Vitamin D upregulates the macrophage complement receptor immunoglobulin in innate immunity to microbial pathogens. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2021.

SÔNEGO, F. *et al.* **Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: Protective and deleterious. Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 26 abr. 2016.

SONI, S. *et al.* Alveolar macrophage-derived microvesicles mediate acute lung injury. **Thorax**, v. 71, n. 11, p. 1020–1029, 1 nov. 2016.

SOUZA, G. D. DE *et al.* UNDERSTANDING THE INTERNATIONAL CONSENSUS FOR ACUTE PANCREATITIS: CLASSIFICATION OF ATLANTA 2012. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery**, v. 29, n. 3, p. 206–210, 1 jul. 2016.

TAKATORI, T. **A Colorimetric Micromethod for the Determination of Serum Cholinesterase Activity.** [s.l: s.n.].

TAN, Z. X. *et al.* Calcitriol inhibits bleomycin-induced early pulmonary inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition in mice. **Toxicology Letters**, v. 240, n. 1, p. 161–171, 5 jan. 2016.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V. DE F. **MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES DA AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DOS GLICOCORTICÓIDES.** Rio de Janeiro: [s.n.].

VANHERWEGEN, A. S.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C. **Regulation of Immune Function by Vitamin D and Its Use in Diseases of Immunity. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**W.B. Saunders, , 1 dez. 2017.

VROLYK, V.; SINGH, B. **Animal models to study the role of pulmonary intravascular macrophages in spontaneous and induced acute pancreatitis. Cell and Tissue Research**Springer, , 1 maio 2020.

WANG, G. J. *et al.* **Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. World Journal of Gastroenterology**Baishideng Publishing Group Co, , 28 mar. 2009.

WILDI, S. *et al.* Suppression of transforming growth factor β signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. **Gut**, v. 56, n. 5, p. 685–692, maio 2007.

YAN, Y. *et al.* NOD receptor and TLR9 modulation in severe acute pancreatitis-induced intestinal injury. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 8471–8476, 1 dez. 2017.

YEH, C.-L. *et al.* Effects of different routes and forms of vitamin D administration on CD4+ T cell homeostasis and renin-angiotensin system-associated lung injury in obese mice complicated with polymicrobial sepsis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, p.

113961, dez. 2022.

ZAHEER, A. *et al.* The revised Atlanta classification for acute pancreatitis: Updates in imaging terminology and guidelines. *Abdominal Imaging*, fev. 2013.

ZHENG, L. *et al.* Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, v. 144, n. 6, p. 1230–1240, 2013.

ZHOU, M.-T. *et al.* Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: Mechanisms and potential intervention. *World J Gastroenterol*, v. 16, n. 17, p. 2094–2099, 2010.

ANEXO



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES NA LESÃO REPERCUSSIVA PULMONAR EM DECORRÊNCIA A PANCREATITE AGUDA", protocolada sob o CEUA nº 3271010621 (ID 001961), sob a responsabilidade de **Pedro Marcos Gomes Soares e equipe; Paulo Roberto Pavão Freire; Álvaro Xavier Franco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 03/09/2021.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE PHENOTYPIC PROFILE OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN LUNG REPERCUSSION INJURY AS A RESULT OF ACUTE PANCREATITIS", utilizing 84 Heterogenics mice (84 males), protocol number CEUA 3271010621 (ID 001961), under the responsibility of **Pedro Marcos Gomes Soares and team; Paulo Roberto Pavão Freire; Álvaro Xavier Franco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 09/03/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2021](#) a [12/2023](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [84](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) da UFC. O laboratório possui toda estrutura necessária para realização dos experimentos.

Fortaleza, 01 de dezembro de 2022

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará